

539, 834

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年7月22日 (22.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/061109 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/54, 9/10, C07K 16/40, C12Q 1/48, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/017030

(22) 国際出願日: 2003年12月26日 (26.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-380975
2002年12月27日 (27.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関 1-3-1 Tokyo (JP). 富士レバイオ株式会社 (FUJIREBIO INC.) [JP/JP]; 〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2丁目 6番 5号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 成松 久 (NARIKAWA HISAKU) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第二 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 工藤 崇 (KUDO, Takashi) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第二 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 梶谷 内品 (TOGAYACHI, Akira) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央

第二 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 比留間 徹 (HIRUMA, Toru) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第二 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目 2番 1号 新大手町ビル 206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GLYCOSYLTRANSFERASE, NUCLEIC ACID ENCODING THE GLYCOSYLTRANSFERASE AND METHOD OF TESTING CANCERATION USING THE NUCLEIC ACID

(57) Abstract: 糖転移酵素、該糖転移酵素をコードする核酸及び該核酸を用いた癌化検定方法

(57) Abstract: A cancer marker nucleic acid which is hybridizable with the base sequence represented by SEQ ID NO:1 or a base sequence complementary thereto under stringent conditions; and a method of testing canceration wherein a biological sample is judged as cancerous in the case of showing a significantly higher transcriptional level of the above nucleic acid than that in a normal biological sample employed as a control. A β 1,3-N-acetyl-D-glucosamine transferase protein having an activity of transferring N-acetyl-D-glucosamine from a donor substrate to a receptor substrate via a β 1,3-bond.

(57) Abstract: 本発明の癌マーカー核酸は、配列番号1に記載の塩基配列又はその相補的な塩基配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸に関し、本発明の癌化検定方法は、生物試料中の該核酸の転写レベルが、対照の正常生物試料のそれを有意に上回る場合に該生物試料が癌化していると判断することを含む方法である。本発明は、供体基質からN-アセチル-D-グルコサミンを受容体基質へ β 1, 3結合で転移する活性を有する β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質にも関する。

BEST AVAILABLE COPY

明細書

糖転移酵素、該糖転移酵素をコードする核酸及び該核酸を用いた癌化検定方法
技術分野

本発明は、新規な核酸、癌化検定用の該核酸、及び生物試料中の該核酸の発現
5 量が異なることに基づく該生物試料の癌化を検定する方法、並びに新規な糖転移
酵素及びこれをコードする核酸等に関する。

背景技術

近年、生体内での糖鎖や複合糖質の働きが注目されている。例えば、血液型を
決定する因子は糖タンパク質であり、また神経系の働きに関与しているのは糖脂
10 質である。従って、糖鎖を合成する働きのある酵素は、様々な糖鎖がもたらす生
理活性を解析する上で極めて重要な手がかりとなる。

糖の中でN-アセチル-D-グルコサミン残基 (GlcNAc) やD-ガラクトース
残基 (Gal) 等はグリコサミノグリカンの構成成分であると共に、スフィンゴ糖
脂質、ムチン型糖鎖、アスパラギン結合型糖鎖 (N 結合型糖鎖) など様々な糖鎖
15 構造に存在する糖残基である。従って、GlcNAc 又は Gal を転移する酵素は、生
体内の様々な組織で働く糖鎖の働きを解析する上で極めて重要なツールとなる。

例えば、GlcNAc を転移する活性を有するN-アセチルグルコサミン酵素は、
表1に示す通り、少なくとも20種類知られており、各々、受容体基質特異性が
異なる (文献1～18)。

20 他方、糖鎖合成は癌化において非常に良く変化することが知られており、癌の
転移や悪性度と相関することが知られている (文献30～32)。また、各種組
織における発現プロファイル等の解析など、今日盛んなそれらの網羅的研究は、
癌化メカニズムの解明にも向けられており、癌化のメカニズムが特定遺伝子の発
現量と関与し得ることはたびたび議論されてきた。癌診断検査法として、血中癌
25 マーカー等の検査、その他の癌化に関与する遺伝子産物等の同定などが既に行わ
れていることは周知のとおりである。癌マーカーの中には、糖鎖に対する抗体も
多く含まれる。とりわけ、癌遺伝子産物に対する免疫学的検定は、感度が高いと
いう利点からたびたび採用されてきた。

表1 N-アセチルグルコサミン転移酵素とその基質特異性

正式名称	略称	結合形式	基質特異性	文献
N-acetylglucosaminyl transferase-I	GnT-I	β 1-2	Man α 1-3 (Man α 1-6) <u>Man</u> α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	1
N-acetylglucosaminyl transferase-II	GnT-II	β 1-2	<u>Man</u> α 1-6 (GlcNAc β 1-2Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	2
N-acetylglucosaminyl transferase-III	GnT-III	β 1-4	GlcNAc β 1-2Man α 1-6 (GlcNAc β 1-2Man α 1-3) <u>Man</u> β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	3
N-acetylglucosaminyl transferase-IV	GnT-IV	β 1-4	GlcNAc β 1-2 (GlcNAc β 1-6) Man α 1-6 (GlcNAc β 1-2 <u>Man</u> α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	5
N-acetylglucosaminyl transferase-V	GnT-V	β 1-6	GlcNAc β 1-2 <u>Man</u> α 1-6 (GlcNAc β 1-2) (GlcNAc β 1-4) Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-Asn	6
N-acetylglucosaminyl transferase-VI	GnT-VI	β 1-4	GlcNAc β 1-2 (GlcNAc β 1-6) <u>Man</u> α 1-6 (GlcNAc β 1-2) (GlcNAc β 1-4) Man α 1-3) Man β 1-4G3cNAc β 1-Asn	7
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase	iGnT	β 1-3	<u>Gal</u> β 1-4GlcNAc β 1-R	8
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase-2	β 3GnT2	β 1-3	<u>Gal</u> β 1-4GlcNAc β 1-R	8
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase-3	β 3GnT3	β 1-3	<u>Gal</u> β 1-3GalNAc-0-S/T	8
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase-4	β 3GnT4	β 1-3	<u>Gal</u> β 1-4 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4) n-R	9
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase-5	β 3GnT5	β 1-3	<u>Gal</u> β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4-Cer	10
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase-6	β 3GnT6	β 1-3	<u>GalNAc</u> -0-S/T	11
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase-7	β 3GnT7	β 1-3	<u>Gal</u> β 1-4 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4) n-Cer	12
β 1, 3-N-acetylglucosaminyl transferase	Fringe	β 1-3	C2-X-X-G-G- <u>Truc</u> -0) S/T-C3	13
β 1, 6-N-acetylglucosaminyl transferase	iGnT	β 1-6	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R	15
Core 2 β 1, 6-N-acetylglucosaminyl transferase-I	C2GnT-I	β 1-6	Gal β 1-3GalNAc-0-S/T	16
Core 2 β 1, 6-N-acetylglucosaminyl transferase-II	C2GnT-II	β 1-6	Gal β 1-3GalNAc-0-S/T	17
Core 2 β 1, 6-N-acetylglucosaminyl transferase-III	C2GnT-III	β 1-6	Gal β 1-3GalNAc-0-S/T	18
α 1, 4-N-acetylglucosaminyl transferase	α 4GnT	α 1-4	<u>Gal</u> β 1-3 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6) GalNAc-R	
peptide β -N-acetylglucosaminyl transferase	OGT	0-	Y-S-D-S-P-S-T-S-T	

アンダーラインの糖またはアミノ酸に対してN-acetylglucosamineを転移する。

表 2

5

文献

- 1 J Biol Chem 10:250 (9):3303-9 (1975)
- 2 Can J Biochem Cell Biol. 61 (9):1049-66. (1983)
- 3 J Biol Chem 10:257 (17):10235-42. (1982)
- 4 J Biol Chem 25:258 (10):6162-73. (1983)
- 5 J Biol Chem 25:257 (22):13421-7. (1982)
- 6 J Biol Chem 20:275 (42):32598-602. (2000)
- 7 Cell 105:957-69 (2001)
- 8 J. Biol. Chem. 276 (5). 3498-507 (2001)
- 9 J Biol Chem 276:22032-40. (2001)
- 10 J Biol Chem 12:277 (15):12802-9. (2002)
- 11 Biochem Biophys. Res. Commun. 294 (4). 843-8 (2002)
- 12 Nature 406:411-5 (2000)
- 13 J. Biol. Chem. 259:13385-90 (1984)
- 14 J. Biol. Chem. 255:11253-61 (1980)
- 15 J. Biol. Chem. 274:3215-21 (1999)
- 16 J. Biol. Chem. 275:11106-13 (2000)
- 17 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 8991-6 (1999)
- 18 J. Biol. Chem. 265:2563-2568 (1990)

文献

文献 30 : Kobata A., Eur. J. Biochem. 15, 209(2), 483-501, 1992

文献 31 : Santer U.V. et al., Cancer Res., Sep, 44(9), 3730-5, 1984

文献 32 : Taniguchi N., Biochim. Biophys. Acta., 1455(2-3), 287-300, 1999

- 5 上述のように癌化に何らかの関与を持つ遺伝子産物の同定により、癌診断上有
用な癌マーカーが提供されると期待されている。なかでも、癌化検定に際して転
写産物中に見出される核酸を指標とすることができれば、その最終産物、例えば
タンパク質の機能解明を待つまでもなく、特定遺伝子の転写産物の同定のみで十
分に癌化検定に有用な指標を提供できる。特に核酸の同定は、DNA マイクロアレ
10 イ上で行うこともできるし、微量でもそれを PCR で増幅して定量することも可能
であるから、免疫学的検定法にはない利点も有する。

- 他方、生体内での糖鎖の働きが注目されているが、生体内での糖鎖合成の解析
は十分に進んでいるとは言えない。糖鎖合成のメカニズム、生体内での糖合成の
局在が十分に解析されていないことも一因である。糖鎖合成のメカニズムを解析
15 するに当たっては、糖鎖合成酵素、特に糖転移酵素を解析し、その酵素を使って
どのような糖鎖が生成されるのかを分析する必要がある。そのために新たな糖転移
酵素を見つけだし、その機能を解析することについての要請も高まっている。

発明の開示

- 上記課題に鑑み、本発明の目的は、癌化に伴ってその転写レベルが有意に変化
20 する癌マーカー核酸、これを標的とした癌化検定用の核酸、及び該核酸を用いた
癌化の検定方法を提供することにある。

- 本発明の別の目的は、上記癌化の指標として注目される特定遺伝子の解析に伴
い、ヒトの新規な糖転移酵素タンパク質をコードする核酸、及び該新規な糖転移
酵素タンパク質を提供することにある。本発明の糖転移酵素タンパク質は、特に
25 、N-アセチル-D-グルコサミンを受容体基質へ $\beta 1, 3$ 結合で転移する活
性を有する $\beta 1, 3$ -N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質で
ある。

本発明のまた別の目的は、該核酸を宿主細胞内で発現する形質転換体、さらに
、当該形質転換体を生育させて、当該タンパク質を単離する方法を提供すること

にもある。

図面の簡単な説明

図 1 は、様々なヒト組織における G9 転写産物の定量的リアルタイム PCR 解析の結果を示す。G9 及び GAPDH (グルセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) についての検量線は各々のプラスミド DNA の段階的希釈により得られた。G9 転写産物の発現レベルは、同じ cDNA において測定された GAPDH に調整した。データは 3 回の実験から得たもので平均値 ± S.D. として示した。

図 2 は、G9 ポリペプチドの活性について反応液の緩衝剤と pH 依存性及び金属イオン依存性を示す。図 2 A において pH の活性への効果がカコジル酸塩 (黒角) 及び HEPES (N-[2-ヒドロキシエチル] ピペラジーン-N'-[2-エタンスルホン酸]) 緩衝剤 (黒円) でアッセイされた。図 2 B において 2 価陽イオンの効果が様々な濃度の $MnCl_2$ (黒円)、 $CaCl_2$ (黒角)、 $MgCl_2$ (黒三角)、 $ZnCl_2$ (白円)、 $NiSO_4$ (白角)、及び $CdSO_4$ (白三角) でアッセイされた。

図 3 は、2-アミノピリジン化オリゴ糖 (N-グリカン) を受容体基質として用いた場合の活性測定の結果を示す。ND は非検出を示す。

図 4 は、 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質 (オロソムコイド)、オボアルブミン、及びオボムコイドを受容体基質として用いた場合の活性測定を示す電気泳動写真である。酵素と基質の反応混合物は、グリコペプチダーゼ F で処置しないか (-) 又は処置し (+)、次いで、SDS-PAGE により分離させた。ゲルは CBB (クマシーブ リリアントブルー) で染色するか (上の写真) 又はオートラジオグラフィーにか けた (下の写真)。

発明の詳細な説明

本発明者等は、目的とする酵素と類似した作用を有する酵素遺伝子の塩基配列を基に、配列相同性が高いと思われる目的とする核酸の単離と精製を試みた。具体的には、まず、公知の糖転移酵素である $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素の配列をクエリーとして BLAST 検索を行い、その結果、相同性を有する配列としてゲノム配列 (GenBank No. AC011462) を見出した。

さらに、PCR でタンパク質をコードする遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列 (配列番号 1) 及び推測アミノ酸配列 (配列番号 2) を決定した。配列

番号 1 の塩基配列を有する遺伝子を G 9 遺伝子、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質を G 9 タンパク質と命名した。これにより、当該核酸がコードするタンパク質が新規な糖転移酵素であることを発見し、さらに、癌化した組織において、前記核酸の発現の有無又はその発現量が健常組織と異なることを見出し、

5 本発明を完成した。本発明者らは、さらに、本発明で得られた核酸を遺伝子工学的に発現し、組換えタンパク質を産生させた。本願発明のタンパク質の活性を確認したところ、供与体基質から N-アセチル-D-グルコサミンを受容体基質へ β 1, 3 結合で転移する活性を有する β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質であることが明らかになった。

10 本発明は、配列番号 1 に記載の塩基配列又はその相補的な塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸に関する。

本発明の核酸は、好ましくは、配列番号 1 に記載の塩基配列中の少なくとも 15 個の連続する塩基配列又はその相補的な塩基配列からなる。

本発明の核酸は、典型的にはプローブまたはプライマーである。また本発明の

15 核酸は、癌マーカーでもあり得る。

本発明はまた、生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 前記何れかに記載の核酸を使用して、生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして

(b) 該生物試料中の該核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断すること

20 を含む方法に関する。

本発明による検定方法の好ましい態様によれば、その生物試料の癌化を検定する方法は、

(a) 前記何れかに記載の核酸を標識されたプローブとして使用し、これを生物試料に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で接触させ、ここでハイブリダイズした核酸の標識からのシグナルに基づき該生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして

25

(b) 該生物試料中の核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断すること

を含む。

本発明による検定方法の好ましい他の態様によれば、その生物試料の癌化を検定する方法は、

5 (a) 標識された前記プライマーを使用して、生物試料について核酸増幅を行い、且つ該核酸増幅産物の量を測定し；そして

(b) の該核酸増幅産物の量が、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む。

さらに、本発明による検定方法の別の態様によれば、本発明の核酸を使用して
10 、癌治療に関する処置の効果を検査することもできる。

本発明により癌治療に関する処置の有効性を検査する方法は、癌治療に関する処置の有効性を検査する方法であって、癌治療のための処置がなされた生物試料中の前記核酸の転写レベルを、本発明によるいずれかの核酸を使用して測定し、該測定値を、該処置前又は未処置のそれと比較することにより、該生物試料への
15 該処置が有効であるか否かを判断することを含む方法である。

本発明による上記処置の有効性を検査する方法の好ましい態様には、既に癌化している前記生物試料を使用し、癌治療のための処置がなされた該生物試料中の前記核酸の転写レベルが、該処置前又は未処置のそれを有意に下回る場合に、該生物試料への該処置が有効であると判断することを含む方法が含まれる。

20 なお、上記処置の有効性を検査する方法を適用し得る生物試料には、非ヒトモデル動物の *in vivo* 生物試料のほか、組織、細胞等（ヒトを含む）由来の *in vitro* 生物試料が含まれる。また、本発明による上記各方法を適用し得る生物試料は、典型的には大腸又は末梢血由来の試料である。

本発明の他の側面において、配列番号 1 の塩基配列は、既知の遺伝子であるヒ
25 トの β 1, 3GlcNAc 転移酵素 2 及び β 1, 3Gal 転移酵素 6 と 31% の相同性があり、保存されているモチーフは β 1, 3Gal 転移酵素に近い。また、一方の β 1, 3GlcNAc 転移酵素 1 とは 60% の相同性がある。さらに、配列番号 2 の推測アミノ酸配列は、その N 末端に糖転移酵素の特徴である疎水膜貫通領域を有する。

上記の観点から、配列番号 1 の核酸配列は、N-アセチル-D-グルコサミン

残基を転移させて、 β 1, 3 結合で糖鎖を合成するヒトの新規な糖転移酵素をコードしていると推測され、そして、実際に生物活性を有する酵素タンパク質が単離・精製され、特定の活性が確認された（実施例 4 及び 5）。

5 また配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質は、新規な糖転移酵素の活性を有するので、この新規なタンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードする核酸を提供することは、当該技術分野におけるこれらの多様な必要性を満たすのに貢献するであろう。

すなわち、本発明は、糖供与体基質から N-アセチル-D-グルコサミン残基を糖受容体基質に β 1, 3 結合で転移する糖転移酵素タンパク質及びそれをコードする核酸にも関する。典型的な糖供与体基質は、UDP-GlcNAc であり、少なくとも Gal β 1, 4GlcNAc 糖鎖残基を受容体基質とする。

したがって本発明は、供与体基質から N-アセチル-D-グルコサミンを受容体基質へ β 1, 3 結合で転移する活性を有する β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質にも関する（「 β 」は糖環 1 位のグリコシド結合の anomeric のうち、シスのものを示す）。

また本発明の糖転移酵素タンパク質には、下記の性質（a）－（c）：

（a）受容体基質の特異性

少なくとも Bz- β -ラクトシド及び／又は Gal β 1, 4GlcNAc 基に対し、有意な転移活性を有する

20 （「Bz」はベンジル基を示し、「Gal」はガラクトース残基を示し、「GlcNAc」は N-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「 β 」は糖環 1 位のグリコシド結合の anomeric のうち、シスのものを示す）；

（b）反応 pH

~~中性又はその~~付近での活性が高い；又は、

25 （c）一価イオンの要求性

前記活性は、少なくとも Mn^{2+} 又は Co^{2+} の存在下で増強される、の少なくとも一つを有するものが含まれる。

特に、本発明の糖転移酵素タンパク質には、4つの Gal β 1, 4GlcNAc 基を有する N結合型糖鎖を持つ受容体基質に有意な活性を有するものが含まれる。

また、本発明の糖転移酵素タンパク質の態様には、下記 (A) ~ (C) の何れか 1 つの配列を有するものが含まれる：

(A) 配列番号 2、配列番号 16 又は配列番号 17 の何れか 1 つのアミノ酸配列；

5 (B) 配列番号 2、配列番号 16 又は配列番号 17 の何れか 1 つのアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、又は挿入したアミノ酸配列；又は

(C) 配列番号 2、配列番号 16 又は配列番号 17 の何れか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 40% 同一であるアミノ酸配列。

10 さらに他の側面において本発明は、上記いずれかの態様の $\beta 1, 3-N$ -アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質をコードする核酸にも関する。

本発明の糖転移酵素タンパク質をコードする核酸の態様には、配列番号 1 に記載の塩基配列全長、その中の塩基番号 76 ~ 1194 の塩基配列、その中の塩基番号 97 ~ 1194 の塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列を含むものが含まれる。そのような核酸は DNA であり得る。

15 更なる他の側面において本発明は、上記のように糖転移酵素タンパク質をコードする核酸を含むベクター、及び該ベクターを含む形質転換体にも関する。さらに本発明は、 $\beta 1, 3-N$ -アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質の製造方法であって、前記形質転換体を生育させ、前記糖転移酵素タンパク質を発現させ、該形質転換体から該糖転移酵素タンパク質を回収することを含む製造方法にも関する。

更なる他の側面において本発明は、上記いずれかの態様の $\beta 1, 3-N$ -アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質を認識する抗体を提供することもできる。

25 また、本発明の核酸が新規糖転移酵素タンパク質をコードするとの知見は、癌組織における該糖転移酵素タンパク質の発現量が健常組織よりを上回っていることを示唆する。よって、生物試料中に発現している本発明のタンパク質を検出又は定量し、対照の健常生物試料中のそれと比較することにより、該生物試料の癌化を検定することも可能であろう。

したがって本発明は、生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 生物試料中の本発明の新規糖転移酵素タンパク質を検出又は定量し；そして

(b) 生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質のそれを有意に上回る場合には癌化していると判断する工程を含む方法にも関する。

ここで新規糖転移酵素タンパク質を検出するためには、糖転移酵素タンパク質を特異的に認識する抗体を使用することが例示される。

発明を実施するための好ましい形態

10 以下、本発明を発明の実施の形態により詳説する。

(1) 癌化に關与する本発明の核酸

本発明者らは、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する核酸が発現していない健全組織、例えばヒト大腸組織では、その癌化により該核酸の発現が確認されること、及び、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する核酸が一般に発現している健全組織、例えば大腸癌患者の末梢血では該核酸の発現量が健常人と比較して有意に増大することを発見した。

したがって、配列番号 1 の塩基配列又はその相補的配列からなる核酸は、生物試料中の転写産物に対する検査において有用な癌マーカーとして着目される。本発明によれば、この癌マーカー核酸にストリンジントな条件下で特異的にハイブリダイズし得る核酸が提供される。

本発明によるプライマー又はプローブは、典型的には、配列番号 1 の塩基配列を有する核酸に由来する天然の DNA フラグメント、配列番号 1 の塩基配列を有するように合成された DNA フラグメント、又はそれらの相補鎖である。

~~特に~~癌マーカー核酸は、BLAST 検索を介して突き止めたもので、それは構造遺伝子をコードする mRNA として転写されている。通常、その ORF 全長またはその部分が試料中に存在し得る。この見地から、該核酸を標的とするプライマー又はプローブとして、配列番号 1 の塩基配列の ORF 全域から、所望の標的配列を選択することができる。本発明のプライマー又はプローブは、配列番号 1 の塩基配列中の部分配列であることもできる。

上記のようなプライマー又はプローブを用いて、後述のように生物試料中の該標的核酸を検出し及び／又は定量することができる。また、ゲノム配列等も標的となりうるので、本発明の核酸を、医学研究用又は遺伝子治療用のアンチセンスプライマーとして提供されることもできる。

5 本発明のプローブ

本発明の核酸をプローブとして使用する場合、その核酸は、配列番号1の塩基配列から選ばれる15塩基以上、好ましくは20塩基以上のオリゴヌクレオチド若しくはその相補鎖であるか、或いは、最長でそのORF領域（塩基番号1-1191）の全長、即ち、1191塩基のcDNA若しくはその相補鎖である。

- 10 特に本発明のプローブは医学研究用の試薬又は診断薬として広く有用である。一般に核酸はあまり分子量が大きいと取り扱いが困難となり、この見地からは、プローブの好ましい塩基長として、50～500塩基、より好ましくは60～300塩基も例示される。

- 15 なお、採用される塩基長及びハイブリダイズ条件等に依存するが、比較的短鎖のオリゴヌクレオチドプローブは、配列番号1の塩基配列又はその相補的な塩基配列と1又は数個の塩基、特に1又は2塩基程度の不一致があってもプローブとしての機能を果たし得る。また、比較的長鎖のcDNAプローブは、配列番号1の塩基配列又はその相補的な塩基配列と50%以下、好ましくは20%以下の不一致があっても、プローブとしての機能を果たし得る。

- 20 また、本発明の核酸が合成オリゴヌクレオチドである場合、その塩基数は15塩基以上、好ましくは20塩基以上である。合成オリゴヌクレオチドの場合、その塩基長及び採用されるハイブリダイズ条件に依存するが、配列番号1に記載した塩基配列又はその相補的な塩基配列と1又は数個の塩基、特に1又は2塩基程度の不一致があってもプローブとしての機能を果たし得る。

- 25 本発明によるオリゴヌクレオチドプローブは、15塩基長もあれば、ストリンジントな条件下で該標的核酸に対して特異的にハイブリダイズし得ることを理解されるべきである。当業者は、オリゴヌクレオチドプローブ設計に関する公知の各種ストラテジーに従い、配列番号1の塩基配列から適切な少なくとも15塩基の部分配列を選択することができる。また、配列番号2のアミノ酸配列情報は

、プローブとして適切と思われるユニークな配列を選定するのに役立つであろう。

ここでストリンジेंटな条件下とは、中程度又は高程度なストリンジेंटな条件下でハイブリダイズすることを意味する。具体的には、中程度のストリンジेंटな条件は、例えば、DNA の長さに基づき、一般の技術を有する当業者によって、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrook ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 3 版、Vol.1、7.42-7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH8.0)の前洗浄溶液、約 40-50℃での、約 50%ホルムアミド、2×SSC-6×SSC (又は約 42℃での約 50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液) のハイブリダイゼーション条件、および約 60℃、0.5×SSC、0.1% SDS の洗浄条件の使用が含まれる。高ストリンジेंटな条件もまた、例えば DNA の長さに基づき、当業者によって、容易に決定することが可能である。一般的に、こうした条件は、中程度にストリンジेंटな条件よりも高い温度及び/又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を含み、例として、より高いハイブリダイゼーション条件、及びおよそ 68℃、0.2×SSC、0.1% SDS の洗浄を伴うと定義される。当業者は、温度および洗浄溶液塩濃度は、プローブの長さ等の要因に従って、必要に応じて調整可能であることを認識するであろう。

上記のように、当業者であれば、当該技術分野において公知の各種プローブ設計及びハイブリダイゼーション条件に関する技術常識、並びに通常用いられる実験手段を通じて得られるであろう経験則を基に、選択されたプローブに適切な中程度にストリンジेंटな条件を容易に見つけ出し、実施することができる。

また、本発明のプローブには、標的配列とハイブリダイズした該プローブを検出または確認するために、蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブが含まれる。本発明による標識プローブの一例は、配列番号 6 の塩基配列 (配列番号 1 中の塩基番号 485-502 の相補鎖に相当する) からなる

オリゴヌクレオチドである。この標識プローブは、標的核酸の PCR 産物を確認又は定量するために使用し得る。また、本発明の標識プローブは、診断用 DNA プローブキット等に組み込まれてもよいし、DNA マイクロアレイ等のチップ上に固定されてもよい。

5 本発明のプライマー

本発明の核酸をプライマーとして使用する場合、その核酸は、オリゴヌクレオチドである。具体的には、配列番号 1 の塩基配列の ORF 領域から以下の条件を満たすように 2 つの領域を選択し：

1) 各領域の長さが 15 塩基以上、好ましくは 18 塩基以上、より好ましくは 21 塩基以上であり、50 塩基以下であること；

2) 各領域中の G + C の割合が 40 - 70 % であること；

選択された 2 つの領域と同じ塩基配列若しくはそれら領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA を製造してもよいし、その塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖 DNA を製造してもよい。本発明のプライマーは、配列番号 1 の ORF 領域中の部分配列と完全に相補的な配列を有することが好ましいが、1 または 2 塩基の不一致があっても差し支えない。

本発明による一对のプライマーの例は、配列番号 4 に記載の塩基配列（配列番号 1 中の塩基番号 450 - 469 の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチド、及び配列番号 5 に記載の塩基配列（配列番号 1 中の塩基番号 531 - 549 の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチドである。

PCR により増幅させた標的核酸を定量するには、使用された一对のプライマーの間に位置する塩基配列から選択されるプローブを使用できる。PCR 産物を検出するための標識プローブの例は、配列番号 6 に記載の塩基配列（配列番号 1 中の塩基番号 485 - 502 の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチドである。

(2) 本発明による癌化の検査方法

本発明の癌化検査方法により、生物試料の転写産物中の標的核酸の転写レベルを測定することができる。その測定の結果は、対照の健常生物試料についての結果と比較される。それら結果の間に有意な差違がある場合に、該生物試料は癌化

した組織であると判断することができる。

また、この検定法において、対照とされる健常組織についての検出結果は、健常生物試料に関する既知データを基に予め一般化された閾値を、対照の検出結果として利用しても差し支えない。例えば、末梢血の検査のように同一患者から健常組織を得られない場合は、健常者から測定された平均値との比較が行われる。

ここで癌化していると判断されるべき有意な差違とは、例えばヒト大腸癌患者からの末梢血におけるように健常組織で該標的核酸が発現しているなら、被検組織中の該標的核酸の実質的な存在（即ち、有意な濃度）が確認されること、或いは、例えば大腸癌組織におけるように健常組織で一般に発現しているなら、被検組織中の該核酸濃度が健常組織のそれを有意に上回っていること、好ましくは被検組織の健常組織に対するその濃度比で1.5倍以上、より好ましくは2倍以上であることをいう。

本発明による癌化検査方法には、典型的にはハイブリダイゼーション検定法及びPCR法が含まれる。

15 ハイブリダイゼーション検定法

本発明で使用し得るハイブリダイゼーション検定法には、例えば、生物試料から抽出された転写産物に対するサザンブロット、ノーザンブロット、ドットブロット、又はコロニーハイブリダイゼーション法等のような当業者に周知である各種ハイブリダイゼーション検定法が含まれる。

20 また、標的核酸の転写量や健常組織との差違に依存するが、当該標的核酸の定量又は検出レベルの増幅が必要とされる場合、ドットブロット若しくはコロニーハイブリダイゼーション等の定量的ハイブリダイゼーション検定法、或いはそれに免疫学的検定法を組み合わせた公知の検査法を使用してもよい。

25 固相化されたハイブリダイゼーション検定法によれば、生物試料から抽出された核酸またはその増幅物が固相化され、標識プローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識が測定される。

生物試料からの転写産物の抽出及び精製には、当業者に知られているあらゆる方法を適用し得る。生物試料から精製されてハイブリダイゼーション検定法に供されるものは、典型的には、生物試料の転写産物総体からのcDNAである。但し

、当該標的核酸の実質的な検出のみをもって癌化とみなせる場合、すなわち健常組織では標的核酸が発現していないと見られる場合の被検組織については、in situ ハイブリダイゼーションのような、転写産物の精製等が不要な検査法を使用することが臨床検査上は実用的であろう。

5 核酸増幅による検査法

本発明によって「本発明核酸の塩基配列」が開示されたため、当業者であれば目的とする本発明の核酸又は調製すべきその一部領域の、両端に位置する塩基配列を基に適宜プライマーを作成し、それを用いて核酸増幅反応（PCR）などによって目的の領域を増幅して調製することが容易である。

- 10 ここで、核酸増幅反応は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）[Saiki R. K., et al., Science, 230, 1350-1354 (1985)]、ライゲース連鎖反応（LCR）
[Wu D. Y., et al., Genomics, 4, 560-569 (1989); Barringer K. J., et al., Gene, 89, 117-122 (1990); Barany F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 189-193 (1991)] 及び転写に基づく増幅 [Kwoh D. Y., et al., Proc.
15 Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173-1177 (1989)] 等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応（SDA）[Walker G. T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396 (1992); Walker G. T., et al., Nuc. Acids Res., 20, 1691-1696 (1992)]、自己保持配列複製（3SR）[Guatelli J. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1874-1878 (1990)] および Q β レプリカーゼシステム [リ
20 ザイルディら、BioTechnology 6, p.1197-1202 (1988)] 等の恒温反応を含む。また、欧州特許第 0525882 号に記載されている標的核酸と変異配列の競合増幅による核酸配列に基づく増幅（Nucleic Acid Sequence Based Amplification: NASABA）反応等も利用可能である。好ましくは PCR 法である。

- 25 転写産物中の標的核酸は、例えば、本発明の標的核酸から選ばれる一対のプライマーを使用した PCR 法を用いて検出することができる。一般に、PCR のような核酸増幅法自体は、当該技術分野において周知であり、そのための試薬キットおよび装置も市販されているので容易に行うことができる。

本発明のプライマー対を用い、そして上記被検核酸を鋳型として用い、PCR による核酸増幅法を行うと、存在する被検核酸が増幅されるのに対し、検体中に被

検核酸が含まれない場合には増幅が起きないので、増幅産物の存在を確認することにより検体中に被検核酸が存在するか否かを知ることができるし、増幅産物を定量することにより被検核酸の転写レベル、すなわち濃度を知ることができる。

PCR の所定サイクル数の繰り返しにより被検核酸は所望の濃度まで増幅されるであろう。また、健常組織中の該核酸も同様にして測定される得る。また、同一組織等に広く一般的に存在する遺伝子の核酸、例えばグリセルアルデヒド-3リン酸-脱水素酵素 (GAPDH)、 β -アクチンをコードする核酸を対照として利用するとよい。

被検核酸は、被検組織又は細胞などの生物試料から抽出された転写産物としての mRNA 総体でも、mRNA から逆転写した cDNA 総体でもよい。被検核酸である mRNA を増幅する場合には、上記一対のプライマーを用いた NASBA 法 (3SR 法、TMA 法) を採用してもよい。NASBA 法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一対のプライマーを用いて容易に実施することができる。

PCR 法で得られた増幅産物の検出又は定量は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブ、例えば、配列番号 6 に記載の標識プローブをハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。

また、被検組織と健常組織との間でそれら標的核酸の「濃度」を比較する場合、定量的 PCR 法を使用することが好ましく、それにはキネティクス分析のための RT-PCR 法、定量的リアルタイム PCR 法が含まれる。先だって精製される標的核酸は mRNA であるから、定量的リアルタイム RT-PCR 法は特に好適である。但し、本検定法における核酸の定量は、定量的 PCR 法に限定されるものではなく、PCR 産物に対して、上述のプローブを用いたノーザンブロット、ドットブロット、DNA マイクロアレイのような公知の他の DNA 定量法を適用し得る。

また、クエンチャー蛍光色素とレポーター 蛍光色素を用いた定量的 RT-PCR を行うことにより、検体中の標的核酸の量を定量することも可能である。特に定量的 RT-PCR 用のキットも市販されているので、容易に行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて標的核酸を半定量することも可能である。

癌治療効果に関する検定方法

上記本発明による癌化検定法は、癌治療効果を検査する方法として使用することもできる。検査対象は、その癌治療効果を検査すべき処置の効果であり、癌化した細胞や組織又は発癌実験モデル動物から得られる腫瘍組織等への処置の効果である。そのような処置には、抗癌剤の投与のほか、放射線治療等のあらゆる処方が含まれる。癌化した生物試料へ又は実験モデル動物の病巣へ処置が行われる。

本発明による癌治療効果の検定法によれば、目的の処置がなされた生物試料中の前記標的核酸の転写レベルが、処置前又は未処置の場合と比較される。また、処置後に転写レベルを追跡してもよい。当該処置に起因して、転写レベルが有意に下がるか、又は仕込まれた上昇が有意に抑制されるなら、該処置はその癌の治療に有効であると評価できる。

この種の検査には、癌化した組織に抗癌剤の候補物質を与えてそれが効くか否か、特に実験モデル動物中の病変組織等にそれが効くか否か、癌患者にとって新たな候補抗癌剤が有効であるか否か等の判断が含まれる。また逆に、発癌するように仕組まれた実験モデル動物において発癌が抑制されるか否か、つまり転写レベルの予期される上昇が有意に抑制されたか否かも評価の対象となる。

本明細書において、核酸の「転写レベル」又は「転写量」というときは、一定量の生物試料中の転写産物に由来する当該核酸の存在量を示す。また、核酸は定量的のために増幅され又は標識のシグナルレベルを増幅され得るのであるから、測定された核酸の量は、増幅された量又は増幅されたシグナルレベルとしても記述され得る。

本明細書において、「被検核酸」又は「標的核酸」というときは、*in vivo* 又は *in vitro* のいずれかを問わず、mRNA や siRNA はもちろんのこと、mRNA を鋳型にして得られるあらゆるタイプの核酸が含まれる。

本明細書において、「生物試料」というときは、器官、組織及び細胞、並びに実験動物由来の器官、組織及び細胞等を示すが、好ましくは組織であり、具体的には、食道、胃、脾臓、肝臓、腎臓、十二指腸、小腸、大腸、直腸、結腸、末梢血が例示される。好ましくは大腸、直腸、結腸及び末梢血であり、より好ましく

は大腸及び末梢血である。また、本明細書において使用される用語「測定」には、検出、増幅、定量、および半定量のいずれもが含まれる。また、本発明の核酸の用途には遺伝子治療も含まれる。

5 本発明の検定方法は、上記の通り、生物試料の癌化を検定するものであり、ここで「癌化の検定」という用語には、生物試料が発癌しているか否かについての検定のほか、悪性度が高いか否かについての検定も含まれ、医療における癌の診断、治療等に応用することができる。本明細書において使用される用語「癌」には、典型的には、悪性腫瘍全般をいい、該悪性腫瘍による疾病状態を含む。本発明検定方法は、限定されるわけではないが、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、十二指腸癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌、及び結腸癌、末梢血、好ましくは大腸癌、直腸癌、及び結腸癌であり、より好ましくは大腸癌の検定に適している。

(2) 新規糖転移酵素をコードする本発明の核酸

15 本発明はまた、上述の核酸の発見に基づき、新規糖転移酵素タンパク質の全長または断片をコードする核酸を提供する。

20 本発明の新規糖転移酵素をコードする核酸は、配列番号1に記載の塩基配列又はその変異した塩基配列からなる核酸、好ましくは配列番号1中の塩基番号76～1194の塩基配列からなる核酸である。配列番号1の核酸には、配列番号2のアミノ酸配列をコードするものが含まれ、また配列番号1中の塩基番号76～1194の核酸には、配列番号16及び17のアミノ酸配列をコードする核酸が含まれる。また、コドンの縮重によりそれらと同一のアミノ酸配列をコードする核酸も本発明に含まれる。これら該核酸は、例えば癌化検定法への利用に適した核酸であることは既に述べた通りである。

25 本発明の新規糖転移酵素をコードする核酸は、一本鎖及び二本鎖型両方のDNA、及びそのRNA相補体も含む。DNAには、例えば、天然由来のDNA、組換えDNA、化学結合したDNA、PCRによって増幅されたDNA、及びそれらの組み合わせが含まれる。但し、ベクターや形質転換体の調製時に安定であるとの観点から、DNAであることが好ましい。

本発明の核酸は、例えば以下の方法により調製することが可能である。

5 1 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の
ホモログタンパク質をコードする可能性のある候補遺伝子を検索し、そのアミノ
酸（ポリペプチド）配列を決定する。すなわち、遺伝子データベースから BLAST
等のプログラムを利用して 1 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子
と相同性のある遺伝子を検索すれば、そのホモログタンパク質をコードするもの
と考えられるヒトゲノム DNA 配列（AC011462: Homo sapiens chromosome 19
clone CTC-435M10）および EST（expressed sequence tag, AW444713）配列など
が見出される。

10 上記のようにして見出された核酸の相補配列又はその一部を利用して、ハイブ
リダイゼーションや核酸増幅反応等の遺伝子工学の基本的手法を用いて cDNA ラ
イブラリーなどから常法に従って核酸増幅反応を行うことで、本発明の核酸を調
製することができる。例えば、PCR 産物として約 1.2kbp の DNA 断片が得られる
ので、これを例えばアガロースゲル電気泳動等の分子量により DNA 断片を篩い分
ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って単離すること
15 ができる。

また、推定アミノ酸配列（配列番号 2）によれば、N 末端に膜貫通領域を有す
ることが予測されるので、この膜貫通領域を有しないポリペプチドをコードする
塩基配列の領域を調製するとにより、可溶化形態のポリペプチドをコードする本
発明の核酸も得ることができる。実際に発明者の実験により、そのアミノ酸配列
20 の N 末側から 26 ないし 33 番目までを除去して、目的の酵素活性を有するポリ
ペプチドを作製できたことから、配列番号 1 中の塩基番号 76～1194 又は塩
基番号 97～1194 の塩基配列からなる核酸は、酵素タンパク質の活性ドメイ
ン領域をコードする領域を含むと考えられる。

25 また、上記ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等を使用してクローニング
される相同な核酸は、配列番号 1 に記載の塩基配列に対して、少なくとも 50 %
、好ましくは少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 70 %以上、さらに
好ましくは少なくとも 80 %、さらになお好ましくは少なくとも 90 %以上、最も好
ましくは少なくとも 95 %の同一性を有する。本発明の核酸は、1 3-N-
アセチルグルコサミン転移酵素タンパク質をコードする核酸であり、配列番号 1

に記載の塩基配列だけでなく、同様の活性、機能、特性等を有するタンパク質（又はその部分）をコードする核酸であれば、本発明の範囲に含まれる。本発明のタンパク質の活性、特性等については、後述の「(5) 本発明の G9 酵素タンパク質」に詳述してある。本発明の核酸は、公知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素タンパク質をコードする核酸、 β 1, 3GlcNAc 転移酵素 2 遺伝子と最も高い同一性を有し、両者の同一性は全長で 31%、活性ドメイン（本発明の配列番号 17 に相当）で 51% である。よって、好ましくは、配列番号 1 に記載の塩基配列に対して少なくとも 55% 同一であり、同様の性質を有する β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素タンパク質をコードする核酸は本発明の範囲に含まれる。

同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって決定することが可能である。あるいは、2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereux ら, Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984 に記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWGCG) より入手可能な G A P コンピュータープログラム、バージョン 6.0 を用いて、配列情報を比較することによって、決定可能である。G A P プログラムの好ましいデフォルトパラメーターには：(1) ヌクレオチドに関する単一 (unary) 比較マトリックス（同一に対し 1 および非同一に対し 0 の値を含む）、並びに Schwartz 及び Dayhoff 監修, Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 353-358, National Biomedical Research Foundation, 1979 に記載されるような、Gribskov 及び Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986 の加重比較マトリックス；(2) 各ギャップに対する 3.0 のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに 0.10 のペナルティ；及び (3) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。当業者に用いられる。配列比較の他のプログラムもまた、使用可能である。

25 (3) 本発明のベクター及び形質転換体

本発明によれば、単離した上記核酸を含む組換えベクターが提供される。プラスミド等のベクターに該核酸の DNA 断片を組込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.1 (2001) に記載の方法などが挙げられる。

簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞（例えば、大腸菌 DH5 α 、TB1、LE392、又は XL-LE392 又は XL-1Blue 等）に導入される。

- 5 プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 16.1 (2001)に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。
- 10

ベクターは、簡単には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、プラスミド DNA 等）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、pDONR201、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322 等が例示されるが、これらに限定されない。

15

- 当業者であれば制限末端は発現ベクターに適合するように適宜選択することが可能である。発現ベクターは、本発明の酵素を発現させたい宿主細胞に適したものを当業者であれば適宜選択することができる。このように本発明による発現ベクターは、上記核酸が目的の宿主細胞中で発現しうるように遺伝子発現に関与する領域（プロモータ領域、エンハンサー領域、オペレーター領域等）が適切に配列されており、さらに該核酸が適切に発現するように構築されていることが好ましい。また、発現ベクターの構築は、制限処理及び連結作業を必要としない、Gateway システム（インビトロジェン社）を用いることもできる。Gateway システムとは、PCR産物の方向性を維持したままクローニングができ、また、DNA断片を適切に改変した発現ベクターにサブクローニングを可能にした部位特異的な組換えを利用したシステムである。具体的には、PCR産物とドナーベクターとから部位特異的な組換え酵素であるB₁₇ドナーゼによってエントリークローンを作成し、その後、このクローンと別の組換え酵素であるLRクロナーゼによって組換え可能なデスティネーションベクターにPCR産物を移入することに
- 20
- 25

より、発現系に対応した発現クローンを調製するものである。最初にエントリークローンを作成すれば、制限酵素やリガーゼで作業する手間の係るサブクローニングステップが不要である点を特徴の一つとする。

発現ベクターの種類は、原核細胞及び／又は真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420 などが好ましく、酵母用発現ベクターとして pYES2 (サッカロマイセス属)、pPIC3.5K、pPIC9K、pA0815 (以上ピキア属)、昆虫用発現ベクターとして pFastBac、pBacPAK8/9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5 などが好ましい。

本発明の上記発現ベクターを宿主細胞に組み込めば、形質転換体を得ることができる。上記宿主細胞は、真核細胞（ほ乳類細胞、酵母、昆虫細胞等）であっても原核細胞（大腸菌、枯草菌等）であってもよい。本発明の形質転換体を得るための宿主細胞は、特に限定されず、さらに、または、ヒト（例えば、HeLa、293T、SH-SY5Y）、マウス（例えば、Neuro2a、NIH3T3）等由来の培養細胞でもよい。これらはいずれも公知であり、市販されているか（例えば、大日本製薬社）、あるいは公共の研究機関（例えば、理研セルバンク）より入手可能である。あるいは、胚、器官、組織若しくは非ヒト個体も使用可能である。

ところで、本発明の核酸はヒトゲノムライブラリーから発見された核酸であるため、本発明においては真核細胞を本発明の形質転換体の宿主細胞として用いることより天然物に近い性質を有した「本発明酵素」が得られる（例えば糖鎖が付加された態様など）と考えられる。従って、「宿主細胞」としては真核細胞、特にほ乳類細胞を選択することが好ましい。ほ乳類細胞としては、具体的には、マウス由来、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはこれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。また、宿主細胞としての大腸菌、酵母又は昆虫細胞は、具体的には、大腸菌（DH5 α 、M15、JM109、BL21 等）、酵母（INVSc1（サッカロマイセス属）、GS115、KM71（以上ピキア属）など）、昆虫細胞

(Sf21、BmN4、カイコ幼虫等)などが例示される。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター／オペレーター領域、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成される

5

宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードする DNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでいてもよい。

10

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (A T G) が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン (例えば、T A G、T G A、T A A など) が例示される。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全 DNA 配列を複製することができる能力をもつ DNA を意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド (天然のプラスミドから調製されたプラスミド) および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミド pQE30、pET 又は pCAL 若しくはそれらの人工的修飾物 (pQE30、pET 又は pCAL を適当な制限酵素で処理して得られる DNA フラグメント) が、酵母ではプラスミド pYES2 若しくは pPIC9K が

15

20

、また昆虫細胞ではプラスミド pBacPAK8/9 等があげられる。

エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれ S V 4 0 に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

25

発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望のタン

5 パク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化や T4 DNA リガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当な DNA フラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

本発明の発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（形質移入）〕は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（*E. coli*, *Bacillus subtilis* 等）の場合は、例えば Cohen らの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法〔*Mol. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979)〕やコンピテント法〔*J. Mol. Biol.*, 56, 209 (1971)〕によって、*Saccharomyces cerevisiae* の場合は、例えば Hinnen らの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1927 (1978)〕やリチウム法〔*J. Bacteriol.*, 153, 163 (1983)〕によって、植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法〔*Science*, 227, 129 (1985)〕、エレクトロポレーション法〔*Nature*, 319, 791 (1986)〕によって、動物細胞の場合は、例えば Graham の方法〔*Virology*, 52, 456 (1973)〕、昆虫細胞の場合は、例えば Summer らの方法〔*Mol. Cell Biol.*, 3, 2156-2165 (1983)〕によってそれぞれ形質転換することができる。

（４）本発明による酵素タンパク質の単離・精製

20 近年は遺伝子工学的手法として、形質転換体を培養、生育させてその培養物、生育物から目的物質を単離・精製する手法が確立されている。

本発明に係る酵素タンパク質は、例えば、上記の如く調製された発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することによって発現（生産）することができる。栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖、メタノールなどが、例示される。無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆抽出液などが例示される。また、所望により他の栄養素（例え

ば無機塩（例えば、NaCl、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。培養は、当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpH及び培養時間は、本発明に係るタンパク質が大量に生産されるように適宜選択される。

本発明に係るタンパク質は、上記培養により得られる培養物より以下のようにして取得することができる。すなわち、本発明に係るタンパク質が宿主細胞内に蓄積する場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞を集め、これを適当な緩衝液（例えば濃度が10～100mM程度のトリス緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液などの緩衝液。pHは用いる緩衝液によって異なるが、pH5.0～9.0の範囲が望ましい）に懸濁した後、用いる宿主細胞に適した方法で細胞を破壊し、遠心分離により宿主細胞の内容物を得る。一方、本発明によるタンパク質が宿主細胞外に分泌される場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞と培地を分離し、培養液を得る。宿主細胞破壊液、あるいは培養液はそのまま、または硫酸沈殿と透析を行なった後に、そのタンパク質の単離・精製に供することができる。単離・精製の方法としては、以下の方法が挙げることができる。即ち、当該タンパクに6×ヒスチジンやGST、マルトース結合タンパクといったタグを付けている場合には、一般に用いられるそれぞれのタグに適したアフィニティークロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。一方、そのようなタグを付けずに本発明に係るタンパク質を生産した場合には、例えば後述する実施例に詳しく述べられている方法、即ちイオン交換クロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。また、これに加えてゲルろ過や疎水性クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィーなどを組み合わせる方法も挙げることができる。

本発明に係る酵素タンパク質を、糖タンパク質、オリゴ糖または多糖等に作用させることにより、所定の糖残基が転移される。従って、本発明に係る酵素は、糖タンパク質の糖鎖の修飾や、糖類の合成に用いることができる。さらに、この酵素を免疫原として動物に投与することにより、該酵素に対する抗体を作製する

ことができ、該抗体を用いて免疫測定法により該酵素を測定することが可能になる。従って、本発明による酵素及びこれをコードする核酸は、このような免疫原の作製に有用である。またこの酵素が合成する糖鎖構造は癌細胞で増加していると考えられ、この糖鎖に対する抗体は癌マーカーとして使用可能であると考えられる。糖鎖に対する抗体では CA19-9 などが癌マーカーとして有用であることが周知である。同様に腫瘍抗原となりうる糖鎖構造を G 9 を使用して合成することができる。

本発明の発現ベクターは、上記のような酵素の単離・精製が容易となるように構築されていることが好ましい。特に、酵素活性を有するポリペプチドと標識ペプチドとの融合タンパク質の形態で発現するように構築した本発明による発現ベクターを用いて遺伝子工学的に当該酵素を調製すれば、単離・精製は容易であろう。

上記識別ペプチドの例としては、本発明に係る酵素を遺伝子組み換えによって調製する際に、該識別ペプチドと酵素活性を有するポリペプチドとが結合した融合タンパク質として発現させることにより、形質転換体の生育物から本発明に係る酵素の分泌・分離・精製又は検出を容易にすることを可能とする機能を有したペプチドである。このような識別ペプチドとしては、例えばシグナルペプチド（多くのタンパク質の N 末端に存在し、細胞内の膜透過機構においてタンパク質の選別のために細胞内では機能している 15～30 アミノ酸残基からなるペプチド：例えば OmpA、OmpT、Dsb 等）、プロテインキナーゼ A、プロテイン A（黄色ブドウ球菌細胞壁の構成成分で分子量約 42,000 のタンパク質）、グルタチオン S 転移酵素 11 タグ（ヒスチジン残基を 6 乃至 10 個並べて配した配列）、myc タグ（cMyc タンパク質由来の 13 アミノ酸配列）、FLAG ペプチド（8 アミノ酸残基からなる合成由来マーカー）、T7 タグ（gene10 タンパク質の最初の 11 アミノ酸残基からなる）、S タグ（脾臓 RNaseA 由来の 15 アミノ酸残基からなる）、HSV タグ、pelB（大腸菌外膜タンパク質 pelB の 22 アミノ酸配列）、HA タグ（ハマグルチニン由来の 10 アミノ酸残基からなる）、Trx タグ（チオレドキシン配列）、CBP タグ（カル+ジュリン結合ペプチド）、CBD タグ（セルロース結合ドメイン）、CBR タグ（コラーゲン結合ドメイン）、 β -lac/blu（ β ラクタマーゼ）、 β -gal（ β ガラ

クトシダーゼ)、luc (ルシフェラーゼ)、HP-Thio (His-patch チオレドキシン)、HSP (熱ショックペプチド)、Ln γ (ラミニン γ ペプチド)、Fn (フィブロネクチン部分ペプチド)、GFP (緑色蛍光ペプチド)、YFP (黄色蛍光ペプチド)、CFP (シアン蛍光ペプチド)、BFP (青色蛍光ペプチド)、DsRed、DsRed2 (赤色蛍光ペプチド)、MBP (マルトース結合ペプチド)、LacZ (ラクトースオペレーター)、IgG (免疫グロブリン G)、アビジン、プロテイン G 等のペプチドが挙げられ、何れの識別ペプチドであっても使用することが可能である。その中でも特にシグナルペプチド、プロテインキナーゼ A、プロテイン A、グルタチオン S 転移酵素、His タグ、myc タグ、FLAG ペプチド、T7 タグ、S タグ、HSV タグ、pelB 又は HA タグが、遺伝子工学的手法による本発明に係る酵素の発現、精製がより容易となることから好ましく、特に FLAG ペプチド (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (配列番号 6) との融合タンパク質として本発明に係る酵素を得るのが、取扱面で極めて優れているため好ましい。上記 FLAG ペプチドは非常に抗原性であり、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現された組換えタンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11 と称されるネズミハイブリドーマは、米国特許第 5,011,912 (これを参照することにより本願明細書の開示に組み込む) に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下で、FLAG ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11 ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号 HB 9259 下に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) に寄託されている。FLAG ペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division、コネチカット州ニューヘブーンより入手可能である。

ほ乳動物細胞で発現可能であって、かつ上述の FLAG ペプチドとの融合タンパク質として本発明に係る酵素を得ることができる基本ベクターとしては例えば pFLAG-CMV-1 (シグマ社製) ある。また、昆虫細胞で発現可能なベクターとしては、pFBIF (pFastBac (インビトロジェン社) に FLAG ペプチドをコードする領域を組み込んだベクター：後述の実施例参照) 等が例示されるが、当業者であれば、当該酵素の発現に使用する宿主細胞、制限酵素、識別ペプチドなどから判断し

て適当な基本ベクターを選択することが可能である。

(5) 本発明の G9 酵素タンパク質

上述のように遺伝子工学的手法に基づき、本発明の配列番号 1 の G9 核酸を用いて特定の酵素活性を有するポリペプチドを単離及び精製することができる。

- 5 第 1 に、上記の観点から、本発明のタンパク質の典型的な態様は、配列番号 1 の核酸配列から推定される配列番号 2 のアミノ酸配列を有する G9 酵素タンパク質である。この酵素タンパク質は、具体的には下記の活性を有する。

触媒反応

- 10 その供与体基質から N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) をその受容体基質へ β 1, 3 グリコシド結合で転移させ、糖鎖を合成することができる。

供与体基質特異性：

- 15 前記 N-アセチル-D-グルコサミン供与体基質には、この糖残基を有する糖ヌクレオチド、例えば、ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) アデノシン二リン酸-N-グルコサミン (ADP-GlcNAc)、グアノシン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (GDP-GlcNAc)、及びシチジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (CDP-GlcNAc) 等が含まれる。典型的な供与体基質は、UDP-GlcNAc である。

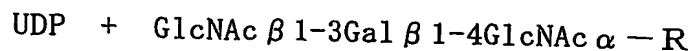
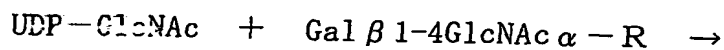
受容体基質特異性 (表 5 参照)：

- 20 典型的な受容体基質としては、pNp- α -Glc、pNp- β -Glc、pNp- α -GlcNAc、pNp- β -GlcNAc、pNp- α -Gal、oNp- β -Gal、pNp- α -GalNAc、pNp- α -Xyl、oNp- β -Xyl、pNp- α -Fuc、Bz- α -Man、Bz- α -ManNAc、Bz- β -ラクトシド、GlcNAc β 1-4GlcNAc β -BZ、Gal β 1-4GlcNAc α -pNp のうち、Bz- β -ラクトシド及び Gal β 1-4GlcNAc α -pNp に対して有意な活性を示し、特に Gal β 1-4GlcNAc α -pNp に対して強い活性を示す。

- 25 なお本明細書において、「GlcNAc」は N-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「GalNAc」は N-アセチル-D-ガラクトサミン残基を示し、「manvac」は N-アセチル-D-マンノサミン残基を示し、「Glc」はグルコサミン残基、「Man」はマンノース残基、「Gal」はガラクトース残基、「Bz」はベンジル基を示し、「pNp」はパラニトロフェニル基を示し、「oNp」はオルトニトロフェニル基を示し、

「-」はグリコシド結合を示す。式中の数字は前記グリコシド結合が存在する糖環の炭素番号を示す。また「 α 」及び「 β 」は糖環1位の前記グリコシド結合のアノマーを示し、5位 CH_2OH 又は CH_3 との位置関係がトランスのものを「 α 」、シスのものを「 β 」で示す。

- 5 したがって、本発明の G9 酵素タンパク質は、例えば次式の反応を触媒する。



(Rは、当該 GlcNAc 残基を有する糖タンパク質、糖脂質、オリゴ糖、又は多糖等である)

- 10 また本発明の G9 酵素タンパク質は、オリゴ糖（例えば2アミノピリジン化オリゴ糖）或いはオリゴ糖残基を有する糖タンパク質に対し、前記転移活性を示す。特に N 結合型糖鎖の非還元末端に前記オリゴ糖鎖残基を4本鎖で有する基質に対し有意に強い活性或いは選択的に有意な活性を示す（図3及び図4参照）。

至適緩衝液及び至適 pH（図2A参照）：

- 15 カコジル酸ナトリウム緩衝液と HEPES 緩衝液のいずれにおいても上記触媒作用を有する。概して中性又はその付近での活性が高い。各緩衝液での活性の pH 依存性としては、カコジル酸ナトリウム緩衝液では pH6.4~7.2 の中性域で pH が大きくなるに伴って活性が上昇し、HEPES 緩衝液では pH7.0 付近で最大の活性を示す。

- 20 二価イオンの要求性（図2B参照）：

ヒト G9 タンパク質の活性は、二価の金属イオンのうち、少なくとも Mn イオンと Zn イオンの存在下で有意に増強され、特に Mn イオンでは顕著に増強される。これらの増強活性は、イオンの低濃度域で急速に上昇し、それ以降は漸次低下する。また、Cd イオンや Ni イオンでは低濃度域で僅かな増強効果があるが、Mg
25 イオンや Zn イオンでは増強効果が実質的に見られない。また通常、糖転移酵素のうち二価イオンを要求するものの多くは、Mn イオンの存在下で反応が増強される。

したがって本発明の G9 酵素タンパク質は、上記所定の酵素反応条件下で GlcNAc 残基を特定の糖鎖に $\beta 1,3$ グリコシド結合で転移させることができるの

で、糖タンパク質などの糖鎖合成ないし修飾反応に有用である。

第2に、本明細書において、上記酵素タンパク質の1次構造を代表する配列番号2に記載のアミノ酸配列が開示されたことで、これらアミノ酸配列に基づき当該技術分野の周知の遺伝子工学的手法により産生され得るあらゆるタンパク質（
5 以下、「変異タンパク質」ないし「修飾タンパク質」とも記述する）が提供される。すなわち、本発明の酵素タンパク質は、当該技術分野の技術常識によれば、配列番号2の推定アミノ酸配列からなるタンパク質のみに限定されず、下記で説明されるように、例えば、アミノ酸配列N末端側等が部分的に欠失した不完全長のポリペプチドからなるタンパク質、或いはそれらアミノ酸配列に相同なタンパク質であって、当該タンパク質の生来的な特性を有するタンパク質をも含まれる
10 と意図される。

先ず、本発明のヒト G9 酵素タンパク質は、後述の実施例で得られたように、好ましくは、配列番号16に記載のアミノ酸配列（配列番号2中のアミノ酸番号26からC末端までのアミノ酸配列）、より好ましくは、配列番号17に記載のアミノ酸配列（配列番号2中のアミノ酸番号33からC末端までのアミノ酸配列）
15 ）であり得る。

また、一般に酵素のような生理活性を有するタンパク質においては、上記アミノ酸配列のうち、1若しくは複数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に1若しくは複数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加された
20 場合であっても、該生理活性が維持され得ることは周知である。また、天然産のタンパク質の中には、それを生産する生物種の品種の違いや、生態型（ecotype）の違いによる遺伝子の変異、あるいはよく似たアイソザイムの存在等に起因して、1個～複数個のアミノ酸変異を有する変異タンパク質が存在することも知られている。この観点から、本発明のタンパク質には、配列番号2、16又17に
25 示される各アミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に1若しくは複数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、上記所定の酵素反応条件下で GlcNAc 残基を Gal 残基に β 1,3 グリコシド結合で転移する活性を有する変異タンパク質も含まれる。さらに、前記修飾タンパク質としては、配列番号2に示される各アミノ

酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものが特に好ましい。

上記において「複数個」とは、好ましくは1～200個、より好ましくは1～100個、さらにより好ましくは1～50個、最も好ましくは1～20個である。一般的には、部位特異的な変異によってアミノ酸が置換された場合に、元々のタンパク質が有する活性は保持される程度に置換が可能なアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個である。

また、本発明の修飾タンパク質には、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換で得られる修飾タンパク質が含まれる。すなわち、一般に同様の性質を有するアミノ酸同士の置換（例えば、ある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性アミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換）を導入して所望の変異を有する組換えタンパク質を作製する手法は当業者に周知であり、そのようにして得られた修飾タンパク質は元来のタンパク質と同様の性質を有することが多い。この観点から、そのようにアミノ酸置換された修飾タンパク質も本発明に含まれる。

また、本発明の修飾タンパク質は、上述した通りのアミノ酸配列を有し且つ目的酵素に生来的な酵素活性を有するものであれば、当該ポリペプチドに糖鎖が結合した糖タンパク質であつてもよい。

また、本発明の相同タンパク質の範囲を特定するに当たり、本発明のアミノ酸配列について GENETYX(ゼネティックス社)による同一性検索を行うと、そのアミノ酸配列は、公知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素2タンパク質と同一性を有し、両者の同一性は全長で37%、活性ドメイン（配列番号17に相当）で39%であることが分かる。この観点から、本発明の相同タンパク質として好適なアミノ酸配列は、概して、配列番号2、10又は17に示されるアミノ酸配列と少なくとも40%の同一性、より好ましくは少なくとも50%の同一性、特に好ましくは少なくとも60%の同一性を有するとよい。これら同様の性質を有する β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素タンパク質

は本発明の範囲に含まれる。

5 なお、前記 GENETYX は、核酸解析、タンパク質解析用の遺伝情報処理ソフトウェアであって、通常のコホモロジー解析やマルチアラインメント解析の他、シグナルペプチド予測やプロモーター部位予測、二次構造予測が可能である。また、本
明細書で用いたコホモロジー解析プログラムは、高速・高感度な方法として多用さ
れている Lipman-Pearson 法 (Lipman, D. J. & Pearson, W. R., Science, 277,
1435-1441 (1985)) を採用している。

10 本願明細書において、同一性のパーセントは、例えば、Altschul ら
(Nucl. Acids. Res., 25, 3389-3402 (1997)) に記載されている BLAST プログラム、あ
るいは Pearson ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2444-2448 (1988)) に記載されている
FASTA を用いて配列情報と比較し決定することが可能である。当該プログラムは
、インターネット上で National Center for Biotechnology Information
(NCBI)、あるいは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから利用するこ
15 とが可能である。各プログラムによる同一性検索の各種条件 (パラメーター) は
同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能である
が、検索は通常デフォルト値を用いて行う。なお、当業者に用いられる、配列比
較の他のプログラムもまた使用可能である。

20 第 3 に、本発明の単離されたタンパク質は、後述のように、これを免疫原とし
て動物に投与することによって該タンパク質に対する抗体を作製することができ
る。そのような抗体を用いて免疫測定法により当該酵素を測定、定量することが
できる。従って、本発明は、そのような免疫原の作製にも有用である。この観点
からは、本発明のタンパク質には、抗体形成を引き出すための抗原決定基又はエ
ピトープを含む、該タンパク質のポリペプチド断片、変異体、融合タンパク質な
ども含まれる。

25 (6) 本発明に係るタンパク質を認識する抗体

本明細書において、本発明の核酸によりコードされる糖転移酵素タンパク質に
免疫反応性である抗体が提供される。このような抗体は、(非特異的結合と対照的
に) 抗体の抗原結合部位を介して、該糖転移酵素タンパク質に特異的に結合する
。したがって、上述のような、配列番号 2、16 又は 17 のタンパク質、断片、

変異体、融合タンパク質などを、それと免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用することが可能である。より具体的には、タンパク質、断片、変異体、融合タンパク質などは、抗体形成を引き出す抗原決定基またはエピトープを含む。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖でも高次構造的（conformational）（断続的）でもどちらでもよい。なお、該抗原決定基またはエピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によって同定してもよい。

したがって、本発明の1つの側面は、本発明の核酸によりコードされる糖転移酵素タンパク質の抗原性エピトープに関する。こうしたエピトープは、以下により詳細に記載されるように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。さらに、本発明に係る糖転移酵素タンパク質のエピトープは、アッセイにおいて、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマ由来の上清などの物質から特異的に結合する抗体を精製する研究試薬として使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、タンパク質の化学的または酵素的切断などの、当該技術分野に公知の技術を用いて、あるいは組換え DNA 技術を用いて、産生することが可能である。

前記糖転移酵素タンパク質によって誘導される可能性がある抗体に関しては、該タンパク質の全部若しくは一部が単離されていても、またはエピトープが単離されていても、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はどちらも、慣用的技術によって調製することが可能である。例えば、Kennet ら（監修），*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, 1980 を参照されたい。

本発明の糖転移酵素タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって産生しそして同定することが可能である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物を該糖転移酵素タンパク質で免疫し；免疫された動物から脾臓細胞を採取し，前記脾臓細胞を骨髓腫細胞株に融合させ、それによりハイブリドーマ細胞を生成し；そして該酵素に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含む。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。

本発明に係るモノクローナル抗体には、キメラ抗体、例えば、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型が含まれる。こうしたヒト化抗体を既知の技術によって調製し、そして抗体がヒトに投与されるとき、免疫原性の減少という利点を提供してもよい。

- 5 慣用的技術によって産生可能な、抗体の抗原結合断片もまた、本発明に含まれる。こうした断片の例には、限定されるわけではないが、F a b および F (a b ')₂断片が含まれる。遺伝子工学技術によって産生される抗体断片および誘導体もまた提供される。

- 10 本発明に係る抗体は、in vitro 又は in vivo いずれかで、前記糖転移酵素タンパク質または断片の存在を検出するアッセイで用いることが可能である。抗体はまた、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、本発明のポリペプチドまたは断片を精製する際にも使用可能である。

- 15 さらに、結合パートナー、例えば受容体基質への前記糖転移酵素タンパク質の結合を遮断することが可能な抗体を用いて、こうした結合から生じる生物学的活性を阻害することが可能である。こうした遮断抗体は、受容体基質を発現している特定の細胞への該タンパク質の結合を阻害する能力に関して、抗体を試験することによるなど、いかなる適切なアッセイ法を用いて、同定してもよい。あるいは、遮断抗体は、標的細胞の結合パートナーに結合している本発明に係る酵素から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいて、同定することが可能である。
- 20

- こうした抗体を、in vitro 法で使用するか、又は in vivo で投与して、抗体を生成した実体によって仲介される生物学的活性を阻害することが可能である。したがって、本発明の糖転移酵素タンパク質と結合パートナーとの相互作用によって、(直接または間接的に)引き起こされるかまたは悪化される障害を治療することが可能である。療法は、結合パートナー仲介生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、ほ乳動物に in vivo 投与することを含む。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。1つの態様において、抗原結合抗体断片が使用される。
- 25

(7) マウス G9 の発見、及び遺伝子操作動物の作製

上記ヒト G9 の発見に伴い、本発明者は、遺伝子データベースから BLAST 検索等を用いて検索した結果、ヒト G9 のマウスオーソログの存在を突き止めた（配列番号 18～20）。

マウス G9 核酸は、全長で 1845 塩基長の配列（配列番号 18）中に 1170 塩基
5 長の ORF（配列番号 19）として見出された。この ORF には 389 個のアミノ酸残基からなるマウスの β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 20）がコードされていると推定される。本願明細書においてヒト G9 に関してなされたあらゆる検討及び考察は、マウス G9 についても同様に適用され得る。

10 本発明は、上記マウス G9 の発見に基づき、受精卵や ES 細胞を用いた各種遺伝子変換技術に基づく動物個体レベルでの G9 の発現・機能解析の手段、典型的には G9 遺伝子を導入したトランスジェニック動物、及びマウス G9 を欠損させたノックアウトマウスをも提供する。

例えば、ノックアウトマウスの作製は、当該技術分野における常法に従って行
15 うことができる（ジーンターゲットイングの最新技術 八木健編集 羊土社：ジーンターゲットイング 野田哲生監訳 メディカル・サイエンス・インターナショナルから買えばよい）。すなわち、当業者であれば、本願において開示されたマウス G9 核酸配列情報を利用し、公知のジーンターゲットイング法に従って mG9 の相同組換え ES 細胞を取得することができ、これを用いて G9 ノックアウト
20 マウスを作製することができる（実施例 6 参照）。

また、最近では small interfering RNA 法により遺伝子発現を抑制する方法が
開示されており（T.R. Brummelkamp et al., Science, 296, 550-553 (2002)）、
このような公知の方法に従い G9 ノックアウトマウスを作製することもできる。

ノックアウトマウスを提供することは、特定の生命現象への G9 遺伝子の関
25 与、すなわち、当該遺伝子の重複性に関する情報のほか、当該遺伝子欠損と個体レベルでの表現型（運動、知能、感覚機能に関するあらゆるタイプの異常が含まれる）との関係、さらには発生、成長、老死といった個体のライフサイクルにおける当該遺伝子の機能の解明に役立つであろう。より詳細には、上記の方法により得られるノックアウトマウスを用いて G9 および mG9 が合成する糖鎖のキャリ

アの検出および生理的機能、疾患との関連等について検討することができる。例えば、ノックアウトマウスより摘出した各組織より糖蛋白質および糖脂質を抽出し、プロテオミックス等の技法（例えば二次元電気泳動、二次元薄層クロマトグラフィ、質量分析等）により野生型マウスと比較することで、合成された糖鎖の

5 キヤリアを同定できる。また、ノックアウトマウスと野生型マウスの表現系（例えば、胎児形成、発育過程、自発行動等）を比較することにより生理的機能や疾患との関連を推定することができる。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

10 実施例

実施例 1 本発明 DNA のクローニング

遺伝子データベースから、Blast [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)]、FASTA 法、PSI-BLAST 法、FrameSearch 法 [Compugen 社製] 等のプログラムを利用して、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子

15 と相同性のある遺伝子または本酵素とアミノ酸レベルで相同性を有するタンパク質をコードする可能性のある遺伝子を検索した結果、ヒトゲノム DNA 配列 (AC011462: Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-435M10) および E S T (AW444713) 配列などを見出した。この配列がコードするポリペプチドは、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素のホモログタンパク質と考えられ、

20 これを G9 と命名した。

以下では、特に断らない限り、遺伝子操作的手法としてモレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている公知の方法を用いた。

大腸癌細胞株 colo205 より RNA を RNeasy Spin Kit (キアゲン社製) で抽出し、Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用

25 いた oligo (dT) 法により single strand DNA とした。この DNA を鋳型とし、5' プライマー (配列番号 3) および 3' プライマー (配列番号 4) を用いて PCR を行った。PCR の条件は 94°C 30 秒、65°C 1 分、72°C 1 分を 25 サイクルとした。PCR により得られた DNA 断片は制限酵素サイトとして ORF の開始コドンの 5' 側に HindIII をストップコドンの 3' 側に EcoRI を有する。

この DNA 断片と pBluescript[®]SKII(-) (TOYOBO 社製) を各々制限酵素である HindIII 及び EcoRI により処理した後、反応液を混合しライゲーション反応を行うことで pBluescript[®] SKII(-) に G9 のその ORF を導入した。反応液をエタノール沈殿法により精製した後、コンピテントセル (大腸菌 DH5 α) と混合し、ヒートショック法 (42°C、30 秒) を行い、IPTG および X-gal を含む LB 寒天培地に播いた。翌日白い単独コロニーを更に培養し、プラスミド DNA を回収した。

回収されたプラスミド DNA に目的の核酸配列が含まれていることを確認し、塩基配列を決定した (配列番号 1)。その塩基配列中の予測されるオープンリーディングフレーム (ORF) は 1194 bp であり、また予測アミノ酸配列にして 397 アミノ酸 (配列番号 2) からなる。その N 末端に糖転移酵素の特徴である疎水アミノ酸領域を有する。該核酸配列および該アミノ酸配列からなるものを G9 と命名した。

G9 が組み込まれる上記 pBluescript[®]II SK(-) は、クローニング操作やシーケンシング操作をより簡便に行うために開発された多機能ベクターであり、従来の pUC や M13 ベクターの機能以外に、様々な改良がなされている。pUC ベクターと同様に、LacZ 遺伝子中にマルチクローニングサイトがあるため、インサートが入ったプラスミドを、XL1-Blue MRF' や JM109 などの lacZ Δ M15 の遺伝子型を持つ大腸菌を形質転換すれば、IPTG/X-gal 添加プレートで白色コロニーを形成し、インサートの有無を簡単に判定できる。また、マルチクローニングサイトは、21 個の制限酵素サイトからなるポリリンカーを有するため、Exo/Mung System によりデリション変異体を作製する場合、使用する制限酵素の選択の幅が広がっている。組み込まれた G9 遺伝子は、LacZ オペレーター/プロモーターによって、lacIq 変異を持つ大腸菌内で発現を調節でき、IPTG を培地に添加することによって、目的タンパク質を大腸菌に産生させることができる。さらに、そのマルチクローニングサイトの両側には、T3 および T7 のプロモーターがあるので、これらのプロモーターによる RNA プロブの作製も可能である。それら両プロモーター配列の両端には BssHII サイトがあり、これを利用して挿入 DNA をプロモーター配列ごと切り出すことができる。両プロモーターのプロブを利用してジーンマッピングを行うことも可能である。このようなベクターには、f1 ファー

ジの複製開始領域が含まれており、VCSM13 や R408 ヘルパーファージの感染により、一本鎖 DNA を産生させ、シーケンスや Site Specific Mutagenesis に使用できる。ヘルパーファージの感染によりアンチセンス側の鎖がレスキューされる。

実施例 2 ヒト大腸癌組織における本発明 DNA の発現量

- 5 定量的リアルタイム PCR 法を用いて同一患者の正常及び大腸癌組織で G9 遺伝子の発現量を比較した。

定量的リアルタイム PCR 法とは PCR においてセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーに加え、蛍光標識されたプローブを組み合わせる方法である。PCR により増幅する際、プローブの蛍光標識が外れて蛍光を示す。蛍光強度が遺伝子の増幅に相関して増幅するためこれを指標として定量を行う。

- 10 ヒト大腸癌組織と同一患者の正常及び大腸癌組織の RNA を RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) で抽出し、Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用いた oligo (dT) 法により single strand DNA とした。この DNA を鋳型として用いて 5' プライマー (配列番号 5)、3' プライマー (配列番号 6) 及び TaqMan プローブ (配列番号 7) を用いて、ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン社製) により定量的リアルタイム PCR を行った。PCR の条件は、50℃ 2 分、95℃ 10 分で反応させた後、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 50 回繰り返した。得られた測定値は、個体間のばらつきを補正するため内標準遺伝子としてアプライドバイオシステムズジャパン社製のキットを用いて定
- 15 量した β -actin により除し、ヒト大腸癌組織の測定値と、同一患者の正常及び大腸癌組織の測定値との間で比較を行った。

その結果、癌化していない組織において本発明 DNA の転写産物は存在しないか測定限界以下であり、癌化した組織においては本発明 DNA の転写産物が有意に存在していることが明らかとなった (表 3 参照)。

表 3

患者番号	正常組織	癌化組織
患者1	0	0.0052
患者2	0	0.0004
患者3	0	0.0023
患者4	0	0.0012
患者5	0	0.0018
患者6	0	0.0028
患者7	0	0.0007
患者8	0	0.0057
平均	0.0000000	0.0025125

10 ヒト末梢血における本発明 DNA の発現量

定量的リアルタイム PCR 法を用いて、健常者と大腸癌患者とで末梢血における G9 遺伝子の発現量を比較した。

健康なボランティアおよび大腸癌患者より PAXgene blood RNA tube (PreAnalytix 社製) に採血した。tube 内の試薬と転倒混和し、24 時間室温において反応させた後、RNA を PAXgene blood RNA kit (PreAnalytix 社製) で抽出した。Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用い、添付の random primers にて cDNA を合成した。この DNA を鋳型として用いて、5' プライマー (配列番号 4)、3' プライマー (配列番号 5) 及び TaqMan プローブ (配列番号 6) を用いて、ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン社製) により定量的リアルタイム PCR を行った。PCR の条件は、50℃ 2 分、95℃ 10 分で反応させた後、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 50 回繰り返した。得られた測定は、個体間のばらつきを補正するため内標準遺伝子としてアプライドバイオシステムズジャパン社製のキットを用いて定量した β -actin により除し、~~健常者~~と大腸癌患者との間で比較を行った。

その結果、健常者に比較して大腸癌患者の末梢血における本発明 DNA の転写レベルは有意に上回っていることが明らかとなった。大腸癌患者のうち、健常者の平均測定値 + (標準偏差 \times 2) を超えるものを陽性と判断する場合、大腸癌患者の陽性率は 67%であった (表 4 参照)。

表 4

番号	健常者	大腸癌患者	判定
1	90	121	陽性
2	107	68	陰性
3	82	199	陽性
4	81	418	陽性
5	87	123	陽性
6		92	陰性
7		196	陽性
8		86	陰性
9		473	陽性
10		267	陽性
11		110	陽性
12		46	陰性
平均	89.4	183.3	
標準偏差	9.4	132.1	

各種のヒト正常組織における本発明 DNA の発現量

上記と同様にして、定量的リアルタイム PCR 法を用いてヒト正常組織由来の本
 15 発明 DNA の発現量 (cDNA) を比較した。これらの組織の RNA はクロンテック社な
 により市販されている。cDNA 合成は Super-Script First-Strand Synthesis
 System (インビトロジェン社製) を使用した。ただし、内部標準の検量線の作成
 においては GAPDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) 遺伝子
 を含む pCR2.1 (Invitrogen) DNA を用いた。G9 の検量線の作成においてはクロ
 ーニングした G9 核酸の ORF を含む pBluescript RSKII(-)ベクターDNA を使用し
 20 た。

その結果、ほとんどのヒト正常組織において本発明 DNA の発現が認められる。
 なかでも骨髄、脾臓、小腸で比較的発現が高いが、大腸や膵臓で発現が非常に
 弱い或いは実質的に発現していないことが明らかとなった (図 1 参照)。

25 実施例 3 単離された G9 全長の発現

pBluescript RSKII(-)に G9 を組込んだプラスミド DNA を用いて pcDNA3.1 (イン
 ビトロジェン社製) を各々制限酵素である ~~Not~~III および EcoRI により処理した
 後、反応液を混合しライゲーション反応を行うことで pcDNA3.1(+)に G9 の ORF
 を導入した。反応液をエタノール沈澱法により精製した後、配列を確認し

pcDNA3.1(+)に G9 が導入されたことを確認し、これを pcDNA3.1(+)-G9 とした。
pcDNA3.1(+)-G9 をコンピテントセル(大腸菌 DH5 α)と混合し、ヒートショック法
(42°C、45 秒)を行い、アンピシリンを含む LB 寒天培地に播いた。翌日単独コロ
ニーを更に培養し、プラスミド DNA を回収した。回収したプラスミド DNA に目的
5 の核酸配列が含まれていることを確認し、塩基配列を決定した。

pcDNA3.1(+/-)は、広範囲な哺乳類細胞の発現用ベクターである。forward 転
写用ベクターであり、発現レベルを上げるため従来の pcDNA3.1 を改良してマル
チクローニングサイト(MCS)配列から RNA の二次構造を形成する可能性のある配
列を除去している。CMV のエンハンサー/プロモーターがあり高いレベルでの発
10 現が可能である。ポリアデニル化シグナルと転写終結配列により RNA が安定化さ
れる。SV40 オリジンがあるため、SV40 Large T 抗原を発現している細胞で複製
が可能である。大腸菌での選択用にアンピシリン抵抗性遺伝子が導入されている
。また、哺乳類細胞において安定株を作製するための選択用としてネオマイシン
抵抗性遺伝子が導入されている。

15 ヒト大腸癌由来細胞株である HCT15 細胞を用いて G9 発現安定株を作製するた
め、以下の操作を行った。HCT15 細胞 2×10^6 個を抗生物質を含まない 10%ウシ胎
児血清 (FBS) RPMI-1640 培地 10ml にて懸濁し、10cm ディッシュに播き、16 時間
37°Cにて CO₂ インキュベーターで培養した。pcDNA3.1(+)-G9 のプラスミド
DNA20ng 及び Lipofectamin 2000(インビトロジェン社製)30 μ l を OPTI-MEM(イン
20 ビトロジェン社製)1.5ml と各々混和し、室温にて 5 分間インキュベーションし
た。更に2つの液を緩やかに混和し、室温にて 20 分間インキュベーションした
。この混合液をディッシュに滴下し、48 時間 37°Cにて CO₂ インキュベーターにて
培養した。定法により細胞を継代した。このとき培地は RPMI-1640(インビトロ
ジェン社製)を用い、ウシ胎児血清および抗生物質としてペニシリン(インビトロ
25 ジェン社製)、ストレプトマイシン(インビトロジェン社製)およびジェネチシン(
ネオマイシン、インビトロジェン社製)を添加した。ジェネチシンを添加するこ
とにより pcDNA3.1(+)-G9 が導入されていない細胞は死滅していくので、培養を
継続することで pcDNA3.1(+)-G9 が導入された細胞のみが生存することになる。こ
れを G9 発現安定株とした。

哺乳類細胞株における G9 組換えタンパク質の発現

G9 の組換えタンパク質を得るためにヒト腎臓由来細胞株 293T で発現させた。機能を確認するには、少なくとも β 1, 3GlcNAc 転移酵素および β 1, 3Gal 転移酵素と比較的相同性が保たれている配列番号 2 中の 105 番アミノ酸から C 末端までの
5 活性領域を発現させれば十分であると考えられるが、ここでは G9 の 24 番アミノ酸及び 33 番アミノ酸から C 末端までの 2 種類の予測活性領域を発現させることとした。

pBluescriptR SK11(-) に G9 を組込んだプラスミド DNA を鋳型とし、5' プライマー (配列番号 8 及び配列番号 9) と 3' プライマー (配列番号 10) を用いて
10 PCR 反応を行い目的の DNA 断片を得た。PCR 法は 94°C 30 秒、65°C 1 分、72°C 1 分を 25 サイクルとした。そして、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法により単離した。この PCR 産物は制限酵素サイトとして 5' 側に HindIII、3' 側に EcoRI を有していた。この DNA 断片と
15 pFLAG-CMV3 を各々制限酵素である HindIII 及び EcoRI にて処理した後、反応液を混合し、ライゲーション反応を行うことで pFLAG-CMV3 に導入した。反応液をエタノール沈殿法により精製した後、コンピテントセル (大腸菌 DH5 α) と混合し、ヒートショック法 (42°C、45 秒) を行い、アンピシリンを含む LB 寒天培地に播いた。

翌日得られたコロニーを、直接 PCR で目的 DNA を確認した。さらに確実を期すためシーケンシングにより DNA 配列の確認をした後、ベクター (pFLAG-CMV3) を
20 抽出・精製した。

ヒト腎臓細胞由来細胞株 293T 細胞 2×10^6 個を抗生物質を含まない 10% ウシ胎児血清入りの DMEM 培地 10ml にて懸濁し、100mm ディッシュに播き、16 時間 37°C にて CO₂ インキュベーターにて培養した。pFLAG-CMV3-G9 の 20ng 及び
25 Lipofectamin2000 (インビトロジェン社製) 30 μ l を OPTI-MEM (インビトロジェン社製) 1.5ml と各々混和し、室温にて 5 分間インキュベーションした。更に 2 つの液を緩やかに混和し、室温にて 20 分間インキュベーションした。この混合液をディッシュに滴下し、48 時間 37°C にて CO₂ インキュベーターにて培養した。

培養上清 10ml に NaN₃ (0.05%)、NaCl (150ml)、CaCl₂ (2ml)、抗 FLAG M1 アフ

イニテীগエル (シグマ社製) (100 μ l) を混合し、4°C で一夜攪拌した。翌日遠心して (3000rpm 5 分、4°C) ペレットを回収し、2ml の $\text{CaCl}_2 \cdot \text{TBS}$ を 900 μ l 加えて再度遠心分離 (2000rpm 5 分、4°C) し、ペレットを 200 μ l の 1ml $\text{CaCl}_2 \cdot \text{TBS}$ に浮遊させ活性測定サンプル (G9 酵素液) とした。この一部を SDS-PAGE による電気泳動について抗 FLAG M2-ペルオキシダーゼ (シグマ社製) を用いてウェスタンブロッティングを行い、目的とする G9 タンパク質の発現を確認した。その結果、約 45kDa の位置にバンドが検出、発現が確認された。

昆虫細胞株における G9 組換えタンパク質の発現

G9 の組換えタンパク質を得るために G9 を昆虫細胞内で発現させた。機能を確認するには、少なくとも β 1, 3GlcNAc 転移酵素および β 1, 3Gal 転移酵素と比較的相同性が保たれている配列番号 2 中の 105 番アミノ酸から C 末端までの活性領域を発現させれば十分であると考えられるが、ここでは G9 の 36 番アミノ酸から C 末端までの予測活性領域を発現させることとした。

pBluescriptR SK11(-) に G9 を組込んだプラスミド DNA を鋳型とし、5' プライマー (配列番号 1 1) と 3' プライマー (配列番号 1 2) を用いて PCR 反応を行い目的の DNA 断片を得た。PCR 法は 94°C 30 秒、65°C 1 分、72°C 1 分を 25 サイクルとした。そして、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法により単離した。このようにして単離した PCR 産物を BP クロナーゼ反応によって pDONR201 (商標) (インビトロジェン社製) へ組み込んで「エントリークローン」を作成した。

反応は上記 PCR 産物 2 μ l、pDONR201 1 μ l (150ng)、BP 反応緩衝液 2 μ l、トリス-HCl-EDTA 緩衝液 (pH8.0 : 以下「TE」とも略記する) 3 μ l、BP クロナーゼ mix 2 μ l を 25°C で 1 時間インキュベーションして行った。その後、プロテイナーゼ K (和光純薬株式会社製) を 1 μ l 加えて 37°C、10 分間インキュベートして反応を止めた。その反応混合液 11 μ l をコンピテントセル (大腸菌 DH5 α) 100 μ l と混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシンを含む LB プレートに播いた。翌日コロニーを回収し、PCR 法で目的 DNA が導入されていること及びその塩基配列を確認し、挿入されたベクター (pDONR-G9) を常法に従って抽出、精製した。このベクターに挿入された DNA の塩基配列は、配列番号 1 記

載の塩基配列を含むことが確認された。

発現クローンの調製

上記エントリークローンは、挿入部位の両端に λ ファージが大腸菌から切り出される際の組換え部位である attL を持つもので、LR クロナーゼ (λ ファージの組換え酵素 Int、IHF、Xis を混合したもの) とデスティネーションベクター (attR を有する) とを混合することで、挿入部位がデスティネーションベクターに移り、発現クローンが作成された。

1 μ l のエントリークローン (pDONR-G9)、0.5 μ l のデスティネーションベクター (pFBIF (75ng))、LR 反応緩衝液 2 μ l、TE4.5 μ l、LR クロナーゼミックス (λ ファージの組換え酵素 Int、IHF、及び Xis を混合した溶液) 2 μ l を 25°C で 1 時間インキュベートし、プロテイナーゼ K (科研製薬株式会社製) を 1 μ l 加えて 37°C で 10 分間インキュベートして反応を停止させた (この組換え反応で pFBIF-G9 が生成される)。pFBIF は pFastBac1 (インビトロジェン社製) に Ig κ シグナル配列と精製用の FLAG ペプチドとを常法に従って挿入した。さらに、pFBIF に Gateway 配列 (attR) を挿入するため、Gateway Vector Conversion System (インビトロジェン社) を用いて変換カセットを挿入した。この変換カセットは、発現ベクターをデスティネーションベクターに改変するためのカセットであり、attR 組換え部位、クロラムフェニコール耐性遺伝子、及び大腸菌 DNA gyrase を阻害するタンパク質をコードする ccdB 遺伝子を有する。また、Ig κ シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAG タグは精製を容易とするために挿入された。

pFBIF-G9 が含まれる反応混液 (11 μ l) とコンピテントセルである大腸菌 DH5 α 100 μ l とを混合し、ヒートショック法による形質転換の後、アンピシリンを含む LB 培地に組換え DH5 α を蒔いて培養した。24 時間培養後、コロニーを回収し、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製) によりプラスミド (pFBIF-G9) を抽出精製した。PCR 法で目的 DNA が挿入されていることを確認した。

Bac-to-Bac システム (インビトロジェン社製) によるバクミドの調製

続いて Bac-to-Bac システム (インビトロジェン社製) を用いて上記 pFBIF-G9 とバクミドとの間で組換えを行い、昆虫細胞中で増殖可能なバクミドに G9 の配列

を挿入した。このシステムは、Tn7 の組換え部位を利用し、バクミドを含む大腸菌（大腸菌 DH10Bac（商標））に目的遺伝子を挿入させた pFastBac（即ち、pFBIF-G9）を導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生させる組換えタンパク質によって目的とする遺伝子（G9）がバクミドに取り込まれるシステムである。また

5 バクミドには LacZ 遺伝子が含まれており、古典的なコロニーの色（青（挿入なし）－白（挿入あり））による選択が可能である。

すなわち、上記精製ベクター（pFBIF-G9）50 μ l とコンピテントセル（大腸菌 DH10Bac）50 μ l とを混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、5-ブロモインドリル β -D-ガラクト

10 ピラノシド（Bluo-gal）、及びイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を含む LB 培地に蒔き、24 時間後にバクミドに目的 DNA が挿入された白い独立したコロニーを回収し、更に培養を行った後、常法に従ってバクミドを回収した。

バクミドの昆虫細胞への導入

15 回収したバクミドに目的 DNA が挿入されていることを常法に従って確認し、バクミドを昆虫細胞（Sf21：インビトロジェン社製）に導入した。すなわち 35mm のシャーレに Sf21 細胞 9×10^5 個/2ml に抗生物質を含む Sf900SFM 培地（インビトロジェン社製）を添加し、27°C で 1 時間細胞を接着させた。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して、lipid-DNA complexes 溶液（A 溶液（100 μ l

20 の Sf-900SFM に上記バクミド 5 μ l を添加した混合物）と B 溶液（100 μ l の Sf-900SFM に 6 μ l の Cellfectin Reagent（インビトロジェン社製）を添加した混合物）とを丁寧に混合して 30 分間程度室温でインキュベートして得た溶液）に Sf900II（インビトロジェン社製）800 μ l を添加した培養液を添加して 27°C で 5 時間インキュベーションした。その後、培地を除去し、抗生物質を含む

25 Sf900SFM 培地 2ml を添加し、27°C で 72 時間インキュベートした。培養後ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収して 1000 \times g で 10 分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「一次ウイルス液」とする）。

更に T75 培養フラスコに Sf21 細胞 1×10^7 個/20ml Sf-900SFM（抗生物質を含む）を添加し、27°C で 1 時間インキュベートした。細胞が接着した後、一次ウイル

ス液 800 μ l を添加し、27°C で 48 時間培養する。培養後、ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収した。これを 1000 \times g で 10 分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「二次ウイルス液」とする）。

さらに、T75 培養フラスコに Sf21 細胞 1×10^7 個/20ml Sf-900SFM（抗生物質を含む）を添加し、27°C で 1 時間インキュベートした。細胞が接着した後、二次ウイルス液 1000 μ l を添加し、27°C で 84 時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収した。これを 1000 \times g で 10 分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「三次ウイルス液」とする）。

さらに、Sf21 細胞を 6×10^5 個/ml の濃度で含む Sf-900SFM（抗生物質を含む）を 100ml 用スピナーフラスコに 100 μ l 添加し、三次ウイルス液 1ml を添加し、27°C で 96 時間培養した。培養後、細胞と培養液を回収した。これを 1000 \times g で 10 分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「四次ウイルス液」とする）。

四次ウイルス液 10ml に対し、 NaN_3 、NaCl 及び CaCl_2 を加えた。終濃度は NaN_3 を 0.05%、NaCl を 150mM、 CaCl_2 を 2mM とする。抗 FLAG M1 抗体アフィニティゲル（シグマ社製）を 50 μ l 添加し、4°C で 16 時間緩やかに転倒混和した。遠心分離（1,000 \times g、3 分、4°C）して上清を除去した後、1mM の CaCl_2 を含む TBS（トリスー塩酸緩衝液：pH7.4）で 2 回洗浄した。そして洗浄後のアフィニティゲルを 1mM の CaCl_2 を含む TBS（pH7.4）200 μ l に懸濁して、この懸濁液を活性測定用の G9 酵素液とした。

実施例 4 哺乳動物細胞発現系による G9 酵素タンパク質の作製

（1）分泌型 G9 ポリペプチド組換え体の作製

上記の実施例で示したように、ポリペプチドの N 末側を欠損させて構築された G9 ポリペプチドは昆虫細胞等内でタンパク質として発現可能であることが確認された。同様にして N 末側を欠損させ、FLAG ペプチド融合型 G9 ポリペプチドとして構築されたタンパク質は、哺乳類細胞発現系により活性を有する酵素タンパクとして単離、精製することもできる。

G9 核酸の ORF のうち、酵素タンパク質の触媒領域と考えられる部分は、pBluescript^R SKII(-) に G9 を組込んだプラスミド DNA を鋳型とし、配列番号 1

3 又は 1 4 のいずれかの核酸配列を有する 5' プライマーと、配列番号 1 5 の核酸配列を有する 3' プライマーを用いて PCR 反応により得ることができた。PCR 法は Pfx Taq DNA ポリメラーゼ(インビトロジェン社製)を用いて計 50 μ l 反応液中、鋳型 5ng の存在下で、94°C15 秒、60°C30 秒、68°C1 分を 25 サイクルとした。そして PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法により単離した。

配列番号 1 3 の 5' プライマーと配列番号 1 5 の 3' プライマーを用いた PCR 反応により、配列番号 1 の塩基番号 7 6 ~ 1 1 9 4 の核酸配列を有する組換え DNA 断片が得られた。これは、配列番号 2 中のアミノ酸番号 2 6 ~ 3 9 7 をコードするもの、すなわち配列番号 1 6 のアミノ酸配列をコードするものに相当する。

また、配列番号 1 4 の 5' プライマーと配列番号 1 5 の 3' プライマーを用いた PCR 反応により、前記の DNA 断片よりも少し短い配列の組換え DNA 断片が得られた。これは、配列番号 1 の塩基番号 9 7 ~ 1 1 9 4 であり、配列番号 2 中のアミノ酸番号 3 3 ~ 3 9 7、すなわち配列番号 1 7 のアミノ酸配列をコードするものに相当する。これら組換え DNA 断片から発現したポリペプチドは、いずれも酵素活性を示していることを確認したが、以下の実験では、配列番号 1 3 と配列番号 1 5 のプライマーを組み合わせて得られる長い方の DNA 断片を使用した。

上記のような G9 ポリペプチドの開始メチオニンが除去された領域にプレプロトリプシンのシグナル配列及び FLAG ペプチド (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys) を付加することにより FLAG ペプチド融合型 G9 ポリペプチドの分泌発現を誘導することができる。すなわち、上記プライマーにて増幅した DNA 断片を制限酵素 Hind III と EcoR I にて消化した後に DNA 精製、pFLAG-CMV3 (Invitrogen, Cat#Is501, CMV)ベクターのクローニング部位の Hind III -EcoR I 間に挿入しライザーション反応を行うことで、pFLAG-CMV3-G9 を造成した。反応液をエタノール沈殿法により精製した後、コンピテン！を Δ (大腸菌 Δ *ompC*) と混合し、ヒートショック法 (42°C、45 秒) を行い、アンピシリンを含む LB 寒天培地に播いた。得られたコロニーは直接 PCR により目的 DNA が含まれていることが確認された。さらに確実を期するためシーケンシングによりプラスミド DNA の配列の確

認をした後、ベクター (pFLAG-CMV3-G9) を抽出・精製した。得られた組換え DNA は、後述のように酵素タンパク質として発現させて精製することができ、その活性を確認できる。ここでコンピューター予測や、予備実験等により、おそらく触媒領域は膜貫通型でも分泌型でも同じエクソン (配列) であることが分かっており、また N 末側は、膜貫通領域などで、とりあえずの活性の確認には必要ない領域であるため、上記のような配列部分を使用した。

前述のように作製した pFLAG-CMV3-G9 プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクトして培養上清中に FLAG ペプチド融合型 G9 ポリペプチドを発現・分泌させた。トランスフェクトの方法は Lipofectamine 2000 (インビトロジェン社製) を用いて付属説明書に則って行った。具体的にはヒト腎臓細胞由来細胞株 293T 細胞 2×10^6 個を抗生物質を含まない 10% ウシ胎児血清入りの DMEM 培地 10ml にて懸濁し、10cm ディッシュに播き、16 時間 37℃ にて CO₂ インキュベータにて培養した。pFLAG-CMV3-G9 の 20ng 及び Lipofectamin 2000 (インビトロジェン社製) 30 μ l を OPTI-MEM (インビトロジェン社製) 1.5ml と各々混和し、室温にて 5 分間インキュベーションした。更に二つの液を緩やかに混和し、室温にて 20 分間インキュベーションした。この混合液をディッシュに滴下し、48 時間 37℃ にて CO₂ インキュベータにて培養した。

なお、配列番号 16 に記載の 372 個のアミノ酸残基は、上記のようにして得られた G9 ポリペプチド部分のアミノ酸配列のうち、FLAG 等含まない部分である。他方、同様にして得られるが少し短い配列番号 17 のポリペプチド部分は、配列番号 16 の配列に含まれるもので、公知の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質との相同性などから見ても活性ドメインと考えられる領域を含む 282 個のアミノ酸残基からなる領域であり、少なくともこの領域を含むものは目的の酵素活性を示すと考えられる

25 (2) 培養液中に分泌された G9 ポリペプチドの精製

上記の G9 ポリペプチド組換え体は、FLAG ペプチドとの融合タンパク質として分泌発現されることになるため、抗 FLAG 抗体アフィニティゲル (シグマ社製) を用いて、容易に精製が可能である。精製された酵素タンパク質は、抗 FLAG M1 アフィニティゲルから遊離させてもよいが、ゲルに吸着したままの酵

素を使用してもよい。本実施例では、ゲルに吸着したままの酵素を用いて実験した。

上記で取得した培養上清 15ml に NaN_3 、 NaCl 及び CaCl_2 を、それぞれ最終濃度 0.1%、150mmol/l および 2mmol/l になるように 添加した後、抗 FLAG M1 アフィニティーゲル (Anti-FLAG M1 Affinity Gel ; コスモ・バイオ社製) を 100 μl 添加し、4°C で一晩ゆっくり攪拌した。

翌日遠心して (3000rpm 5 分、4°C) ペレットを回収し、2 mM の $\text{CaCl}_2 \cdot \text{TBS}$ を 900 μl 加えて再度遠心分離 (2000 rpm 5 分、4°C) し、ペレットを 200 μl の 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{TBS}$ に浮遊させ活性測定のサンプル (G9 酵素液) とした。この一部を SDS-PAGE による電気泳動について抗 FLAG M2-ペルオキシダーゼ (シグマ社製) を用いてウエスタンブロッティングを行い、目的とする G9 タンパク質の発現を確認した。その結果約 45kDa の位置にバンドが検出、発現が確認された。

洗浄後、該ゲルに 50mmol/l トリス-塩酸 (pH7.4)、150mmol/l NaCl 、2mmol/l EDTA を含む緩衝液 30 μl を添加し、4°C で 30 分間処理することにより、ゲルに吸着したタンパク質を溶出した。その後、160×g で 10 分間遠心分離することにより上清を取得した。ゲルに再度 50mmol/l トリス-塩酸 (pH7.4)、150mmol/l NaCl 、2mmol/l EDTA を含む緩衝液 30 μl を添加し、4°C で 10 分間処理した後、160×g で 10 分間遠心分離することにより上清を取得した。その後、上記の操作を再度行い、合計 3 回溶出操作を行い、得られた溶出液には、最終濃度が 4mmol/l になるように 1mol/l CaCl_2 を添加した。この溶出液を酵素源として使用した。

実施例 5 G9 酵素タンパク質の酵素活性の解析 (糖脂質や合成単糖類などを基質として用いた活性測定)

25 図 2 記載のアミノ酸配列を基に、他の公知の糖転移酵素と対比した結果、活性部位と考えられる C-末端領域の配列の保存性などから、G9 は転移酵素類に分類されることが示唆された。そこで、例えば、UDP-GlcNAc を GlcNAc 供与体基質として用いて、上記実施例 4 で得られた G9 ポリペプチドを含む酵素液の酵素活性を確認することができる。

本実施例では、下記の参考文献 [1] - [3] に記載の方法とほぼ同様の方法に従っ

て G9 酵素の活性の測定した。

[1] Shiraishi N, Natsume A, Togayachi A, Endo T, Akashima T, Yamada Y, Imai N, Nakagawa S, Koizumi S, Sekine S, Narimatsu H, Sasaki K. Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-
5 acetylglucosaminyltransferases structurally related to the beta 1,3-galactosyltransferase family. J Biol Chem. 2001 Feb 2;276(5):3498-507.:

[2] Togayachi A, Akashima T, Ookubo R, Kudo T, Nishihara S, Iwasaki H, Natsume A, Mio H, Inokuchi J, Irimura T, Sasaki K, Narimatsu H. Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc:lactosylceramide
10 beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids. J Biol Chem. 2001 Jun 22;276(25):22032-40.:

[3] Iwai T, Inaba N, Naundorf A, Zhang Y, Gotoh M, Iwasaki H, Kudo T, Togayachi A, Ishizuka Y, Nakanishi H, Narimatsu H. Molecular cloning and
15 characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide β 1,3-N acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans. J Biol Chem. 2001 Jun 22;276(25):22032-40.

(1) 基質特異性の検討

20 上記実施例で得られた FLAG ペプチド融合型 G9 ポリペプチドの β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を、単糖・オリゴ糖・糖脂質・糖タンパク質を基質として既知の方法（前述の参考文献、及び FEBS, 462, 289 (1999)、J. Biol. Chem. 269, 14730-14737(1994)、及び J. Biol. Chem., 267, 23507 (1992)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)など）に従って測定した。

25 受容体基質として、pNp- α -Glc、pNp- β -Glc、pNp- α -GlcNAc、pNp- β -GlcNAc、pNp- α -Gal、oNp- β -Gal、pNp- α -GalNAc、~~pNp- α -Xyl~~、~~pNp- β -Xyl~~、pNp- α -Fuc、Bz- α -Man、Bz- α -ManNAc、core1- α -~~pNp~~、core3- α -pNp、Bz- β -ラクトシド、GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Bz、Gal β 1-4GlcNAc α -pNp を使用した（表 5 参照）。これら基質はシグマ社あるいはトロントリサーチケミカルズ（Toronto

Research Chemicals) 社などより購入することができる。

表 5

G9 の基質特異性

5	受容体基質		相対活性
			%
10	1	Gal α -pNP ^a	ND
	2	Gal β -oNP ^a	ND
	3	GlcNAc α -Bz ^b	ND
	4	GlcNAc β -Bz ^b	ND
	5	GalNAc α -pNP ^a	ND
	6	GalNAc β -pNP ^b	ND
	7	Glc α -pNP ^a	ND
	8	Glc β -pNP ^a	ND
	9	Fuc α -pNP ^a	ND
	10	Xyl α -pNP ^c	ND
15	11	Xyl β -pNP ^b	ND
	12	Man α -Bz ^c	ND
	13	ラクトシド β -Bz ^b	27
	14	Gal β 1-3GalNAc α -pNP (core 1) ^c	ND
	15	GlcNAc β 1-3GalNAc α -pNP (core 3) ^c	ND
	16	Gal β 1-3GlcNAc β -pNP ^a	ND
	17	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Bz ^c	ND
	18	Gal β 1-4GlcNAc α -pNP ^c	100
20			

(表 5 において ND は検出なし。受容体基質の a はカルバイオケム (Calbiochem) 社、b はシグマ社、c はトロントリサーチケミカルズ社から購入した)

受容体基質に放射能ラベルされた基質を用いる場合の基本的な反応液は、14 mM HEPES 緩衝液 pH7.4, 10mM MnCl₂, 0.15% Triton CF-54, 0.75mM ATP, 50 μ M UDP-GlcNAc (シグマ社製), 4.5 μ M (50nCi) [¹⁴C]UDP-GlcNAc (アマンヤムバイオサイエンス社製)、10 μ M 基質 (上記の受容体基質)、及び適量 (5~10 μ l) の精製酵素タンパク質 (実施例 4 で得られた酵素源) で計 20 μ l である。酵素反応は 37℃ で数時間から 16 時間まで行った (通常 16 時間)。

反応終了後、0.1M KCl を 200 μ l 加え、軽く遠心後上清を取得した。10ml のメタノールで1回洗浄後、10ml の 0.1M KCl で2回洗浄して平衡化した Sep-Pak C18 Cartridge(Waters)に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。1ml の HPLC 用純水にて2回カートリッジを洗浄後、1ml のメ
5 タノールで吸着した基質および生成物を溶出した。液体シンチレーター (ACSII、アマシャムバイオサイエンス社製) に混和した後、シンチレーションカウンターにて生成物の放射線の量を測定した。

その結果、G9 ポリペプチドは、テストされた上記受容体基質のうち Gal β 1-4GlcNAc α -pNp に最も転移活性を示し、Bz- β -ラクトシドに対しても多少転移する活性を示した (表5参照)。
10

(2) 酵素反応条件の検討

反応液及び反応時間は上記と同様としたが、14mM HEPES 緩衝液 pH7.4 の代わりに HEPES (pH6.75~7.4) 及びカコジル酸ナトリウム (pH6.4~7.2) のバッファ条件を検討した (図2A)。

15 図2Aに示される通り、G9 ポリペプチドは、カコジル酸ナトリウムと HEPES のいずれを使用しても活性を示した。概して中性又はその付近での活性が高く、カコジル酸ナトリウムでは pH6.4~7.2 の中性域で pHが大きくなるに伴って活性が上昇し、HEPES では pH7.0 付近で最大の活性を示した。

また、糖転移酵素は金属イオンを要求するものがあるので、G9 酵素の金属イ
20 オン要求性について検討を行った。反応液及び反応時間は上記と同様とし、10mM MnCl₂ の代わりに MnCl₂、CoCl₂、MgCl₂、ZnCl₂、NiCl₂、CdCl₂を使用した。各金属イオンの濃度は 2.5、10、40mM としそれぞれの酵素反応を行った (図2B)。

図2Bに示される通り、G9 ポリペプチドの活性は、二価の金属イオンのうち
25 、少なくとも Mn イオン又は Co イオンの存在下で有意に増強され、特に Mn イオンでは顕著に増強される。これらの増強活性は、イオンの低濃度域で急速に上昇し、それ以降は漸次低下する。また、Cd イオンや Ni イオンでは低濃度域で僅かな増強効果があるが、Mg イオンや Zn イオンでは増強効果が実質的に見られなかった。

また上記の結果から、上記（１）で用いた基本的な反応条件で最も活性が強く出ることが確認された。以下の実験でも同条件を用いて反応を行った。

（３）２－アミノピリジン化オリゴ糖（Ｎ－グリカン）を受容体基質として用いた場合の活性測定

- 5 基質としては、市販の PA 化オリゴ糖を使用した。オリゴ糖の２－ピリジルアミノ化は、常法（Hase, S. Ibuki, T. and Ikenaka, T., J. Biochem. 95, 197-203(1984)）に従って行うことができ、PA 化オリゴ糖は宝酒造、あるいは生化学工業株式会社から購入した。具体的な試験方法は下記の通りである。

- 10 14mM HEPES 緩衝液、pH7.4, 50mM UDP-GlcNAc, 10mM MnCl₂, 0.15% Triton CF-54、40pmol 受容体基質（PA 化オリゴ糖）、及び適量（200ng）の精製酵素タンパク質を含む計 20 μ l の反応液中で 37℃、16 時間反応後、生産物を高速液体クロマトグラフィー（HPLC；詳細は後述する）により検出した。前記精製酵素タンパク質としては、実施例 4 において抗 FLAG M1 抗体アフィニティーゲルで精製された酵素を使用した。

- 15 反応が終了したアッセイ溶液を 100℃で 5 分間処理後、HPLC 用純水 80 μ l を加え、10,000×g で 5 分間遠心して上清を取得した。次いで、該上清を Ultrafree-MC（Millipore 社製）に通した後、その一部（40 μ l）を HPLC に供する。Ultrafree-MC カラムの使用法は付属の説明書に従って行った。

- 20 HPLC は、カラムとして PALPAK Type R カラム（タカラ社製）、溶出液として溶出液 A：100mM 酢酸/トリエチルアミン（pH4.0）、溶出液 B：100mM 酢酸/トリエチルアミン（pH4.0）/0.5% 1-ブタノールを用いて 5～55%溶出液 B グラジエント（30 分）、カラム温度 40℃、流速 1ml/分の条件で行った。生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーター RF-10AXL（島津製作所社製）を用いて行った（励起波長 320nm、放射波長 400nm）。

- 25 この結果、G9 ポリペプチドは、4 本鎖の N－グリカン（PA-004、PA-011：TAKARA の PA 化基質番号）に有意な活性を示した（図 3 参照）。これに対し、公知の β 1, 3－N－アセチルグルコサミン転移酵素 2（ β 3GnT2）は糖鎖の本数に依らず PA-001～0011 のタイプの N－グリカンに活性を示す。このことから本実施例の G9 ポリペプチドは、4 本鎖の N－グリカンに有意な活性を

示すが、1～3本鎖のN-グリカンには有意な活性を示さないという選択的活性を有することも示唆される。なお、図3の結果においてG9ポリペプチドの活性を β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素2のそれと比較すると比較的弱く見えるが、これは β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素2が非常に酵素活性の強いホモログ酵素であるからである。

(4) 糖タンパク質を受容体基質として用いた場合の活性測定

糖タンパク質を基質にした酵素反応を行った。反応液は、14mM HEPES 緩衝液 pH7.4, 10mM $MnCl_2$, 0.15% Triton CF-54, 0.75mM ATP, 50 μ M UDP-GlcNAc (シグマ社製)、4.5 μ M (50nCi) [^{14}C]UDP-GlcNAc (アマシャムバイオサイエンス社製)、40 μ g 受容体基質、及び適量 (5～10 μ l) の精製酵素タンパク質で計 20 μ l とした。前記受容体基質としては α 1-酸性糖タンパク質 (オロソムコイド; シグマ社製)、オボアルブミン (シグマ社製)、又はオボムコイド (シグマ社製) などを用いた。前記精製酵素タンパク質としては、実施例4において抗 FLAG M1 抗体アフィニティゲルで精製された酵素を使用した。

反応は 37℃で数時間から 16 時間行った。反応物の一部をグリコペプチダーゼ F (GPF、タラカ社製) による酵素消化を説明書に従って行い、酵素消化前のサンプルと酵素消化後のサンプルをともに 10% SDS-PAGE にて解析した (図4)。

その結果、G9 ポリペプチドは、いずれの糖タンパク質 (オボアルブミンは比較的弱い) に対しても GlcNAc 転移活性を示し、また GPF 消化によってバンドが消失することから、これらの転移反応が各糖タンパク質のN-グリカン糖鎖に行われていることが確認された。

実施例6 G9 ノックアウトマウスの作製

mG9 遺伝子は少なくとも ORF はシングルエクソンであると考えられる。ノックアウトしたい mG9 の活性化ドメインと思われる領域、例えば、配列番号1の塩基番号 97～1194 の塩基配列を含む約 10 kb 断片を中心とした染色体断片 (約 10 kb) を pBluescript II SK(-) (TOYOBO 製) に挿入したクローニングベクター (pBSK-mG9-KOneo) を作製する。pBSK-mG9-KOneo には薬物耐性遺伝子として neo (ネオマイシン耐性遺伝子) を mG9 の予測される GlcNAc 転移活性領域が欠失し、この部分が neo で置換される。こうして得られた pBSK-mG9-KOneo を制限酵

- 素である NotI にて直鎖状とした後、80 μ g を ES 細胞 (E14 / 129Sv マウス由来) にトランスフェクション (エレクトロポレーション等) し、G418 耐性のコロニーを選択する。G418 耐性コロニーを 24 ウェルプレートに移し、培養を行う。細胞の一部を凍結保存した後、残りの ES 細胞から DNA を抽出し、PCR により組み換えが起こっているクローンを 120 コロニー程度選択する。さらに、PCR とサザンブロットティング等により組み換えが予定通り起こっているかの確認を行い、最終的に組み換え体を 10 クローン程度選択する。選択したうちの 2 クローンの ES 細胞を C57BL/6 マウスの胚盤胞内に注入する。ES 細胞を注入したマウス胚を仮親マウスの子宮内へ移植してキメラマウスを誕生させる。その後、ジャームトランスミッションによりヘテロノックアウトマウスを得ることができる。
- 5
- 10

請求の範囲

1. 配列番号 1 に記載の塩基配列又はその相補的な塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸。
2. 配列番号 1 に記載の塩基配列中の少なくとも 15 個の連続する塩基配列又はその相補的な塩基配列からなる、請求項 1 の核酸。
3. 配列番号 1 に記載の塩基配列又はその相補的な配列からなる、請求項 2 の核酸。
4. プローブまたはプライマーである、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載の核酸。
- 10 5. 癌マーカーである、請求項 1 ～ 4 の何れか 1 つの核酸。
6. 生物試料の癌化を検定する方法であって、
 - (a) 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の核酸を使用して、生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして
 - (b) 該生物試料中の該核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む方法。
- 15 7. 生物試料の癌化を検定する請求項 6 の方法であって、
 - (a) 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の核酸を標識されたプローブとして使用し、これを生物試料にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で接
 - 20 触させ、ここでハイブリダイズした核酸の標識からのシグナルに基づき該生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして
 - (b) 該生物試料中の核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む方法。
- 25 8. 生物試料の癌化を検定する請求項 6 の方法であって、
 - (a) 標識された請求項 4 のプライマー ~~を使用して~~、~~生物試料について~~核酸増幅を行い、且つ該核酸増幅産物の量を測定し、そして
 - (b) の該核酸増幅産物の量が、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断すること

を含む方法。

9. 癌治療に関する処置の有効性を、請求項1～5の何れか1項に記載の核酸を使用して検査する方法であって、

5 癌治療のための処置がなされた生物試料中の前記核酸の転写レベルを、請求項1～5の何れか1項に記載の核酸を使用して測定し、該測定値を、該処置前又は未処置のそれと比較することにより、該生物試料への該処置が有効であるか否かを判断することを含む方法。

10. 既に癌化している前記生物試料を使用し、癌治療のための処置がなされた該生物試料中の前記核酸の転写レベルが、該処置前又は未処置のそれを有意に下回る場合に、該生物試料への該処置が有効であると判断することを含む、請求項9の方法。

11. 前記生物試料が、非ヒトモデル動物の *in vivo* 生物試料である、請求項9又は10の方法。

15 12. 前記生物試料が大腸又は末梢血由来の試料である、請求項6～11の何れか1項に記載の方法。

13. 供与体基質からN-アセチル-D-グルコサミンを受容体基質へ β 1, 3 結合で転移する活性を有する β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質：

(「 β 」は糖環1位のグリコシド結合のアノマーのうち、シスのものを示す)。

20 14. 下記の性質 (a) - (c)：

(a) 受容体基質の特異性

少なくとも Bz- β -ラクトシド及び／又は Gal β 1-4GlcNAc 基に対し、有意な転移活性を有する

25 「Bz」はベンジル基を示し、「Gal」はガラクトース残基を示し、「GlcNAc」はN-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「 β 」は糖環1位のグリコシド結合のアノマーのうち、シスのものを示す)；

(b) 反応 pH

中性又はその付近での活性が高い；又は、

(c) 二価イオンの要求性

前記活性は、少なくとも Mn^{2+} 又は Co^{2+} の存在下で増強される；
の少なくとも一つを有する、請求項 13 の糖転移酵素タンパク質。

15. 4つの Gal β 1-4GlcNAc 基を有するN結合型糖鎖を持つ受容体基質に有意な活性を有する、請求項 13 又は 14 の糖転移酵素タンパク質。

5 16. 下記 (A) ~ (C) の何れか1つの配列を有する、請求項 13 ~ 15 の何れか1項に記載の糖転移酵素タンパク質：

(A) 配列番号 2、配列番号 16 又は配列番号 17 の何れか1つのアミノ酸配列；

10 (B) 配列番号 2、配列番号 16 又は配列番号 17 の何れか1つのアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、又は挿入したアミノ酸配列；又は

(C) 配列番号 2、配列番号 16 又は配列番号 17 の何れか1つのアミノ酸配列と少なくとも40%同一であるアミノ酸配列。

15 17. 請求項 13 ~ 16 のいずれか1項に記載の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質をコードする核酸。

18. 配列番号 1 に記載の塩基番号 97 ~ 1194 の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列を含む、請求項 17 の核酸。

19. DNA であることを特徴とする、請求項 18 の核酸。

20. 請求項 18 又は 19 の核酸を含むベクター。

20 21. 請求項 20 のベクターを含む形質転換体。

22. β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質の製造方法であって、請求項 21 の形質転換体を生育させ、前記糖転移酵素タンパク質を発現させ、該形質転換体から該糖転移酵素タンパク質を回収することを含む製造方法。

25 23. 請求項 13 ~ 16 のいずれか1項に記載の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素タンパク質を認識する抗体。

図 1

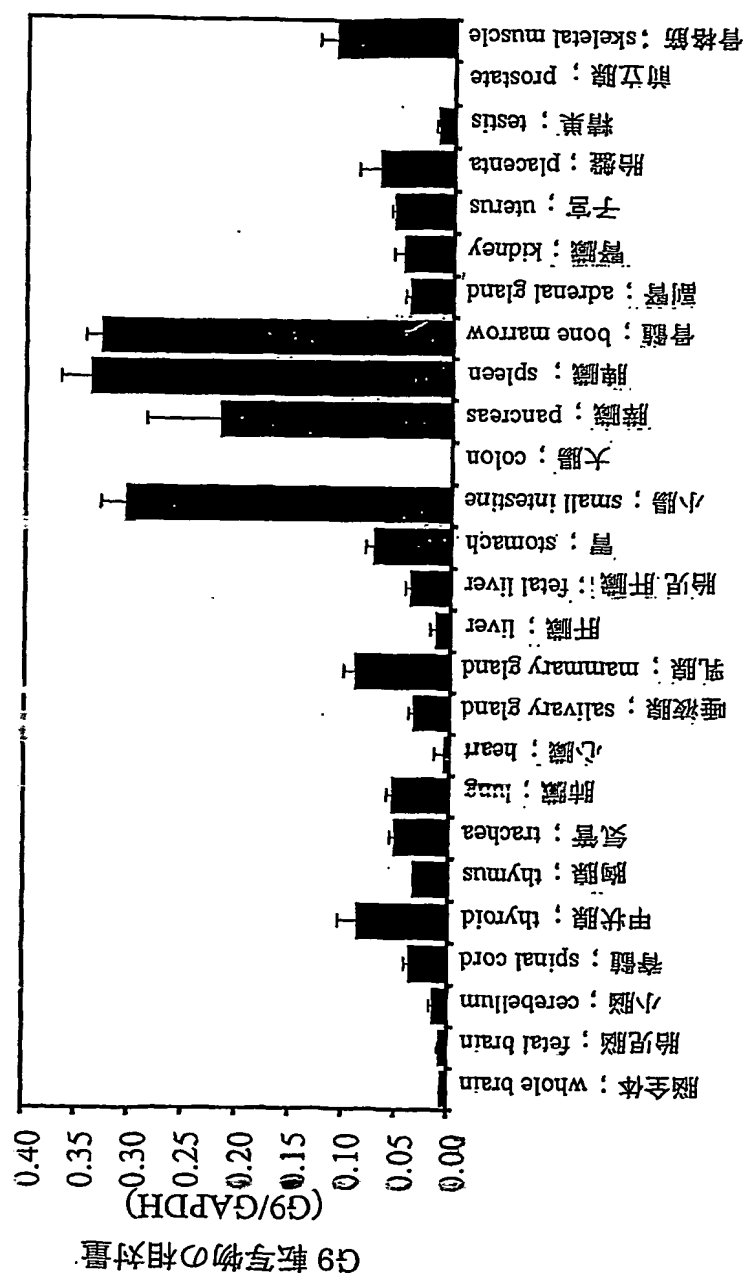


図 2

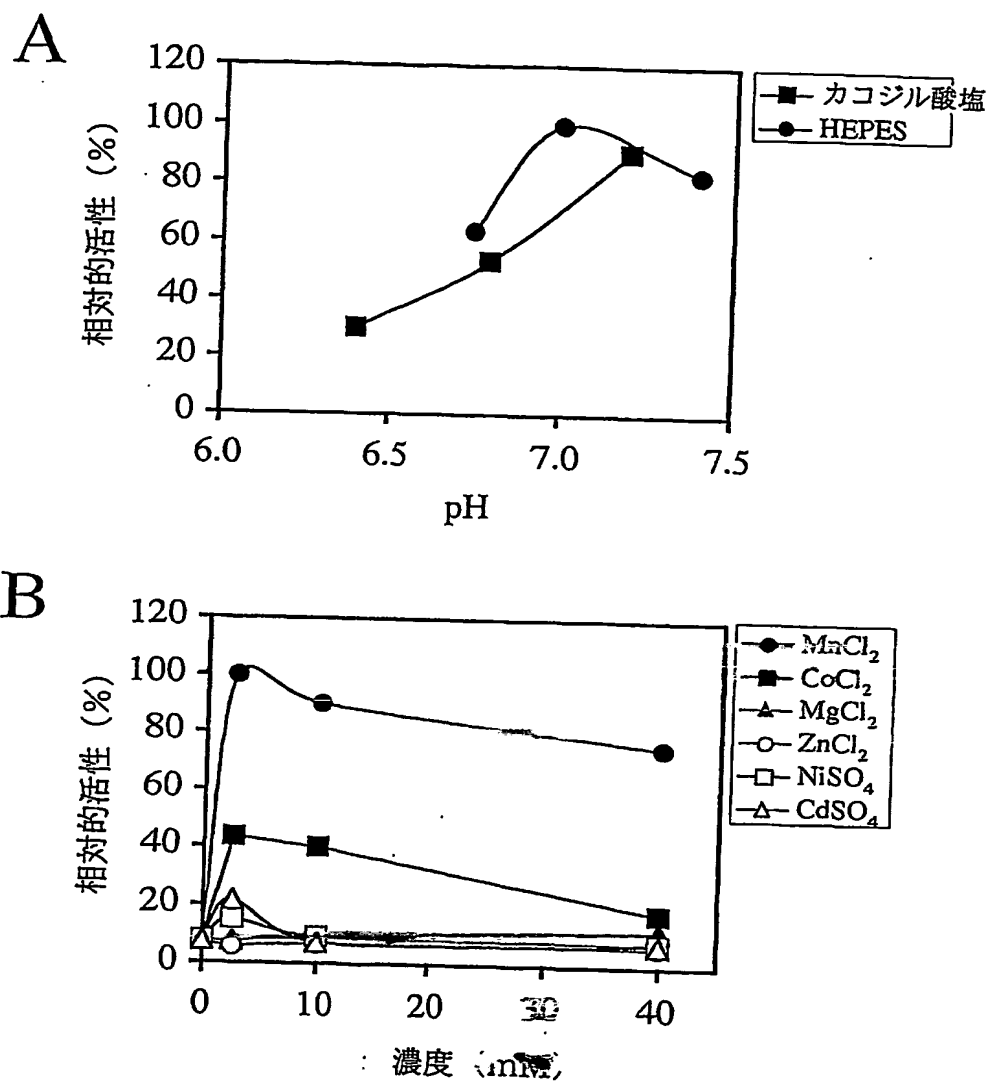


図 3

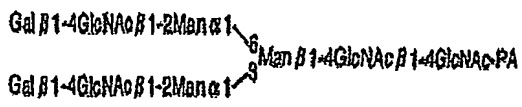
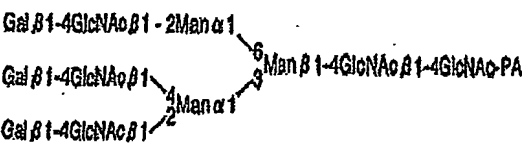
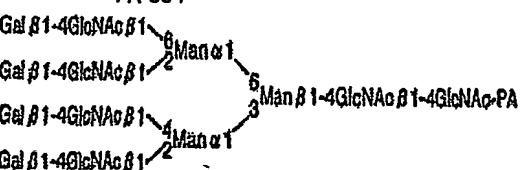
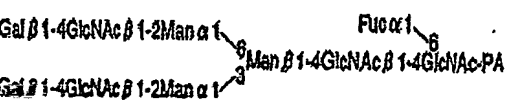
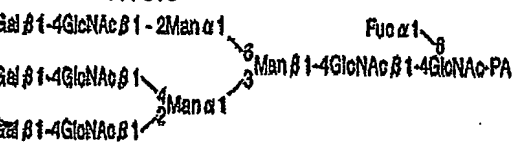
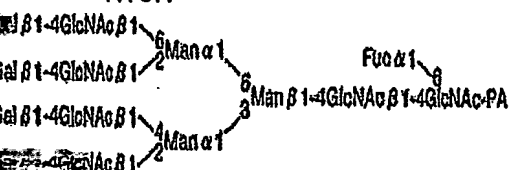
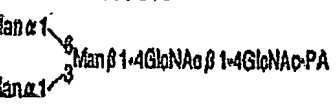
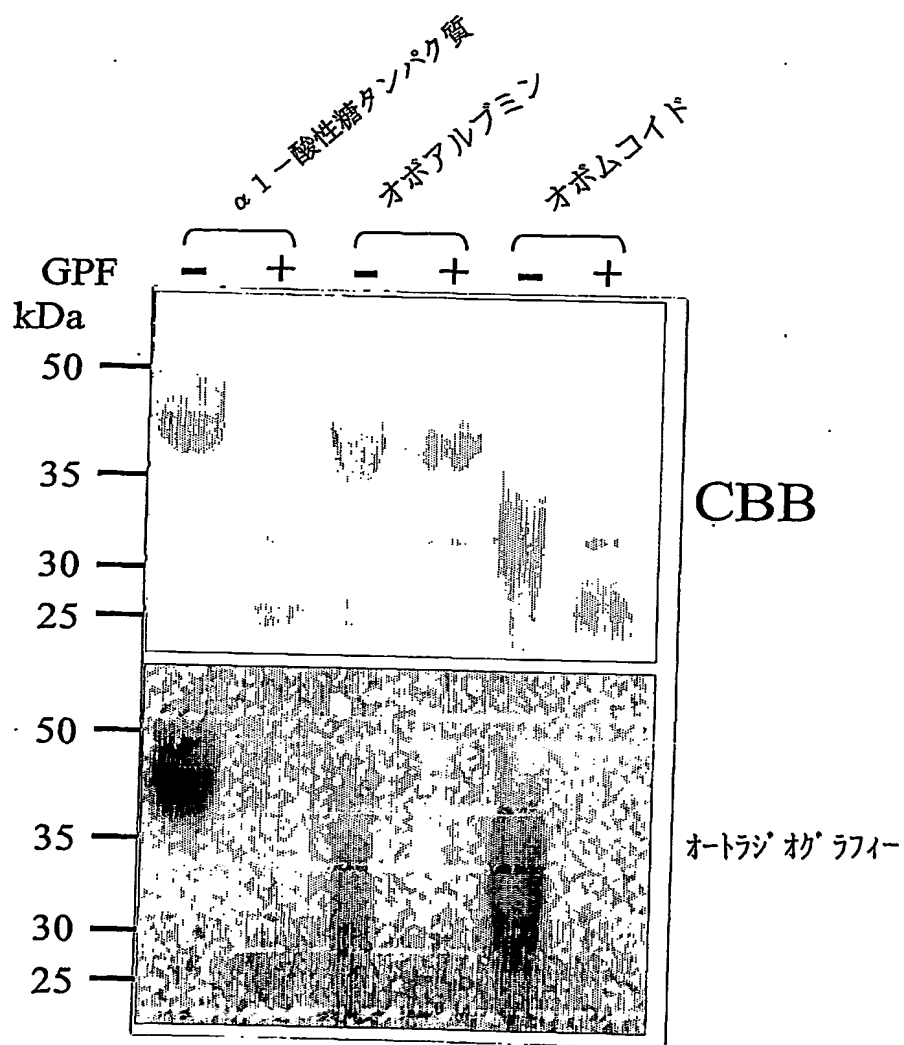
基質 (PA-糖)	UDP-グルコサミン 転移効率(%)	
	$\beta 3\text{GnT2}$	G9
PA-001 	100	ND
PA-002 	100	ND
PA-004 	100	14.7
PA-009 	100	ND
PA-010 	100	ND
PA-011 	100	8.9
PA-016 	ND	ND

図 4



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Fujirebio Incorporated

<120> A glycosyl transferase, a DNA encoding the same, and a method
for detection for cancer

<130> YCT-902

<160> 20

<210> 1

<211> 1194

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcgctgcc ccaagtgcct tctctgcctg tcagcactgc tcacactcct gggcctcaaa 60
gtgtacatcg agtggacatc cgagtccegg ctacagcaagg cctaccccag cctcggggc 120
accccgccaa gcccacgcc agccaacct gagcccaccc tacctgccaa cctctccacc 180
cgccctgggcc agactatccc gctgcccitt gcttactgga accagcagca gggcgggctg 240
gggtccctgc ccagtgggga cagcactgaa acggggggct gccaggcttg gggggccgcc 300
gccgccaccg agatccctga ctctgcctcc taccacaagg acctccgccg etctcttcig 360
tcaggagctt gccggagctt cccacagtgg ctgcctggag gtggiggcag ccaagtcctc 420
agctgcctag atactgatgt cccctacctg ctgttggccg tcaagtcaga accagggcgc 480
tttgcagaac gacaggccgt gagagagacg tggggcagtc cagctccagg gatccggctg 540
ctcttctctg tagggctctc ggtgggtgag gcggggcctg acctagactc actagtggcc 600
ggggggcc gtcgctacag tgacctgctg ctctgggact tctctgacgt cccattcaac 660
cagacgtca aagacctgct gctgctggcc tggctgggcc gccactgccc caccgtgagt 720

ttgtcttgc gagctcagga cgatgccitt gtacacaccc ctgccctgct ggctcacctg 780
 cgggccctgc cacctgcctc ggcccgaagc ctctacctgg gtgaggtctt taccaggcc 840
 atgcctctcc ggaagccagg aggacccttc tatgtgcccg agtccittctt cgaagggtggc 900
 taccagcct atgcaagcgg ggggtggctac gtcatgtccg ggcgccctggc accctggctg 960
 ctgcgggagg cagcccgtgt ggcacccttc cctttgagg acgtctacac tggcctttgc 1020
 atccgagccc tgggcctggt gcccaggcc caccaggct tcctcacagc ctggccagca 1080
 gaccgcactg cggaccactg tgctttccgc aacctgctgc tggtagggcc cctgggcccc 1140
 caggccagca ttggctctg gaaacaactg caagaccaa ggctccagt ctga 1194

<210> 2

<211> 397

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Cys Pro Lys Cys Leu Leu Cys Leu Ser Ala Leu Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Lys Val Tyr Ile Glu Trp Thr Ser Glu Ser Arg Leu Ser
 20 25 30
 Lys Ala Tyr Pro Ser Pro Arg Gly Thr Pro Pro Ser Pro Thr Pro Ala
 35 40 45
 Asn Pro Glu Pro Thr Leu Pro Ala Asn Leu Ser Thr Arg Leu Gly Gln
 50 55 60
 Thr Ile Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Trp Asn Glu Gln Gln Trp Arg Leu
 65 70 75 80
 Gly Ser Leu Pro Ser Gly Asp Ser Thr Glu Thr Gly Gly Cys Gln Ala
 85 90 95
 Trp Gly Ala Ala Ala Ala Thr Glu Ile Pro Asp Phe Ala Ser Tyr Pro
 100 105 110
 Lys Asp Leu Arg Arg Phe Leu Leu Ser Ala Ala Cys Arg Ser Phe Pro

115 120 125
 Gln Trp Leu Pro Gly Gly Gly Ser Gln Val Ser Ser Cys Ser Asp
 130 135 140
 Thr Asp Val Pro Tyr Leu Leu Leu Ala Val Lys Ser Glu Pro Gly Arg
 145 150 155 160
 Phe Ala Glu Arg Gln Ala Val Arg Glu Thr Trp Gly Ser Pro Ala Pro
 165 170 175
 Gly Ile Arg Leu Leu Phe Leu Leu Gly Ser Pro Val Gly Glu Ala Gly
 180 185 190
 Pro Asp Leu Asp Ser Leu Val Ala Trp Glu Ser Arg Arg Tyr Ser Asp
 195 200 205
 Leu Leu Leu Trp Asp Phe Leu Asp Val Pro Phe Asn Gln Thr Leu Lys
 210 215 220
 Asp Leu Leu Leu Leu Ala Trp Leu Gly Arg His Cys Pro Thr Val Ser
 225 230 235 240
 Phe Val Leu Arg Ala Gln Asp Asp Ala Phe Val His Thr Pro Ala Leu
 245 250 255
 Leu Ala His Leu Arg Ala Leu Pro Pro Ala Ser Ala Arg Ser Leu Tyr
 260 265 270
 Leu Gly Glu Val Phe Thr Gln Ala Met Pro Leu Arg Lys Pro Gly Gly
 275 280 285
 Pro Phe Tyr Val Pro Glu Ser Phe Phe Glu Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr
 290 295 300
 Ala Ser Gly Gly Gly Tyr Val Ile Ala Gly Arg Leu Ala Pro Trp Leu
 310 315 320
 Leu Arg Ala Ala Ala Arg Val Ala Pro Phe Pro Phe Glu Asp Val Tyr
 325 330 335
 Thr Gly Leu Cys Ile Arg Ala Leu Gly Leu Val Pro Gln Ala His Pro
 340 345 350
 Gly Phe Leu Thr Ala Trp Pro Ala Asp Arg Thr Ala Asp His Cys Ala

355	360	365
Phe Arg Asn Leu Leu Leu Val Arg Pro Leu Gly Pro Gln Ala Ser Ile		
370	375	380
Arg Leu Trp Lys Gln Leu Gln Asp Pro Arg Leu Gln Cys		
385	390	395 397

<210> 3

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 31

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 3

ctcaagctta tgcgctgccc caagtgcctt c

31

<210> 4

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 31

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 4

ctcgaattct cagcactigga gccttgggtc t

31

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR

<400> 5

gctgttggcc gtcaagtcag

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR

<400> 6

caggaagagc agccggat

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe for RT-PCR

<400> 7

cagaacgaca ggccgtga

18

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 8

gccaaacctta catccgagtc ccggctcag

29

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 9

gccaaacctta aggcctaccc cagccctcg

29

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 10

cggaattctc agcactggag ccttgggt

28

<210> 11

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 11

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt ccccagccct cggggcaccc cgcca

55

<210> 12

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 12

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcagcactgg agccttgggt cttg

54

<210> 13

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 13

gccaaagctta catccgagtc ccggctcag

29

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 14

gccaaagctta aggcctaccc cagccctcg

29

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 15

cggaatttc agcactggag ccttggt

28

<210> 16

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Thr Ser Glu Ser Arg Leu Ser Lys Ala Tyr Pro Ser Pro Arg Gly Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Ser Pro Thr Pro Ala Asn Pro Glu Pro Thr Leu Pro Ala Asn
 20 25 30
 Leu Ser Thr Arg Leu Gly Gln Thr Ile Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Trp
 35 40 45
 Asn Gln Gln Gln Trp Arg Leu Gly Ser Leu Pro Ser Gly Asp Ser Thr
 50 55 60
 Glu Thr Gly Gly Cys Gln Ala Trp Gly Ala Ala Ala Ala Thr Glu Ile
 65 70 75 80
 Pro Asp Phe Ala Ser Tyr Pro Lys Asp Leu Arg Arg Phe Leu Leu Ser
 85 90 95
 Ala Ala Cys Arg Ser Phe Pro Gln Trp Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Ala Val Ser Ser Cys Ser Asp Thr Asp Val Pro Tyr Leu Leu Leu Ala
 115 120 125
 Val Lys Ser Glu Pro Gly Arg Phe Ala Glu Arg Gln Ala Val Arg Glu
 130 135 140
 Ala Trp Gly Ser Pro Ala Pro Gly Ile Arg Leu Leu Phe Leu Leu Gly
 145 150 155 160
 Ser Pro Val Gly Glu Ala Gly Pro Asp Leu Asp Ser Leu Val Ala Trp
 165 170 175
 Glu Ser Arg Arg Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Trp Asp Phe Leu Asp Val

180 185 190
 Pro Phe Asn Gln Thr Leu Lys Asp Leu Leu Leu Leu Ala Trp Leu Gly
 195 200 205
 Arg His Cys Pro Thr Val Ser Phe Val Leu Arg Ala Gln Asp Asp Ala
 210 215 220
 Phe Val His Thr Pro Ala Leu Leu Ala His Leu Arg Ala Leu Pro Pro
 225 230 235 240
 Ala Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Leu Gly Glu Val Phe Thr Gln Ala Met
 245 250 255
 Pro Leu Arg Lys Pro Gly Gly Pro Phe Tyr Val Pro Glu Ser Phe Phe
 260 265 270
 Glu Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Tyr Val Ile Ala
 275 280 285
 Gly Arg Leu Ala Pro Trp Leu Leu Arg Ala Ala Ala Arg Val Ala Pro
 290 295 300
 Phe Pro Phe Glu Asp Val Tyr Thr Gly Leu Cys Ile Arg Ala Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Val Pro Gln Ala His Pro Gly Phe Leu Thr Ala Trp Pro Ala Asp
 325 330 335
 Arg Thr Ala Asp His Cys Ala Phe Arg Asn Leu Leu Leu Val Arg Pro
 340 345 350
 Leu Gly Pro Gln Ala Ser Ile Arg Leu Trp Lys Gln Leu Gln Asp Pro
 355 360 365
 Arg Leu Gln Cys
 370 372

<210> 17

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Arg Phe Leu Leu Ser Ala Ala Cys Arg Ser Phe Pro Gln Trp Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Ser Ser Cys Ser Asp Thr Asp Val
 20 25 30
 Pro Tyr Leu Leu Leu Ala Val Lys Ser Glu Pro Gly Arg Phe Ala Glu
 35 40 45
 Arg Gln Ala Val Arg Glu Thr Trp Gly Ser Pro Ala Pro Gly Ile Arg
 50 55 60
 Leu Leu Phe Leu Leu Gly Ser Pro Val Gly Glu Ala Gly Pro Asp Leu
 65 70 75 80
 Asp Ser Leu Val Ala Trp Glu Ser Arg Arg Tyr Ser Asp Leu Leu Leu
 85 90 95
 Trp Asp Phe Leu Asp Val Pro Phe Asn Gln Thr Leu Lys Asp Leu Leu
 100 105 110
 Leu Leu Ala Trp Leu Gly Arg His Cys Pro Thr Val Ser Phe Val Leu
 115 120 125
 Arg Ala Gln Asp Asp Ala Phe Val His Thr Pro Ala Leu Leu Ala His
 130 135 140
 Leu Arg Ala Leu Pro Pro Ala Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Leu Gly Glu
 145 150 155 160
 Val Phe Thr Gln Ala Met Pro Leu Arg Lys Pro Gly Gly Pro Phe Tyr
 165 170 175
 Val Pro Leu Ser Phe Phe Glu Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr Ala Ser Gly
 180 185 190
 Gly Gly Tyr Val Ile Ala Gly Arg Leu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Ala
 195 200 205
 Arg Val Ala Pro Phe Pro Phe Glu Asp Val Tyr Thr Gly Leu
 210 215 220

Cys Ile Arg Ala Leu Gly Leu Val Pro Gln Ala His Pro Gly Phe Leu
 225 230 235 240
 Thr Ala Trp Pro Ala Asp Arg Thr Ala Asp His Cys Ala Phe Arg Asn
 245 250 255
 Leu Leu Leu Val Arg Pro Leu Gly Pro Gln Ala Ser Ile Arg Leu Trp
 260 265 270
 Lys Gln Leu Gln Asp Pro Arg Leu Gln Cys
 275 280 282

<210> 18

<211> 1845

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 18

ggaggacgca cagctgag gagggagtcc gggcagggt ttacccgagg accccagag 60
 ctggcggaag ctggaccag aggtacctgg ggcccaggc cctgggggtg gggtactgga 120
 ggaggtaggt aggttccaa gaaggtaaaa aggagtttcc ccgggaagct gggactcctg 180
 aagagacaga ggaatgaggg aaggggagta ggaagagccg ttggagcgat actgcaaata 240
 gatataacac catgactgca gaaaaggaaa gaatgggggg tcgaggggag gcggtgttca 300
 gtctaggata acgttaagtt gggactgtga gttcagtctg cctagggtca gactctcaga 360
 agccattaac agaactgggt aggaactagg ctgcttgcct gggcttcgct gggccgtctt 420
 tggagatcca cctgcaccc taaagacttc tgtggctct tctgactctt gcagcccccac 480
 tgggtggcct ttcctgggc cgggtcatgc gttgccga ~~ga ggaagctc~~ tgctgtcag 540
~~cactgttcac~~ actctgggc ctcaagtat ~~acatgagtg~~ gacatccgag tcttggtta 600
 aaaaggetga accccggggc gctctgcca gtccacacc accaatgct gagccactc 660
 tgcccaccaa cctctcagca cgctgggtc agactgggc ~~actgtctct~~ gcttactga 720
 accagcagca gcggcagctg ggagtcctgc ccagtacga ctgtcagact tgggggactg 780
~~atgcgctc~~ ggagatcttg gacttcatcc tgtacccca ggagcttcgg cgcttcttgc 840
 tgtcggcggc ctgtaggagc ttccactat ggctgcctgc aggagaaggc agccctgtgg 900

ccagctgctc tgataaggat gtaccctact tgctactggc tgtcaaatca gaaccaggac 960
 actttgcagc acggcaggct gtgagggaga cctggggcag ccagttgct gggacccggt 1020
 tgctcttctt gctgggggtcc cccctaggaa tggggggggcc tgacttaaga tctactggtga 1080
 cgtgggaaag ccggcgctat ggtgacctac tgctctggga ctctctggat gttccctaca 1140
 accggacact caaggacctg ctgctgctga cctggctgag ccaccactgc ccgatgtca 1200
 attttgcct gcagggtcag gatgatgcct ttgtgcacat ccagcccta ctggagcacc 1260
 tgcagactct gccaccacc tgggcccgca gcctctacct gggtgagatc ttcaccagg 1320
 ccaaaccgct ccgaagccc ggaggacct tctatgtgcc gaagacctc tttgaagggg 1380
 actatccagc ctatgcgagt ggagggtggt atgtaatctc aggacgctg gcaccctggc 1440
 tgctgcaggc ggcagctgc gtggcacct tccctttga tgatgtctac actggcttct 1500
 gcttccgtgc cctgggctta gcaccccggt ccatccagg ctctctaca gcctggccag 1560
 cagaacgtac cagggacccc tgcgccgtgc gaggcctgct cttggtgcat ccagtcagcc 1620
 ctcaggacac ctttggctc tggagacatc tgtgggtccc agagctccag tgctgaccgg 1680
 cagagacaag ctgggggtggg tgggtgctga cctggcctga gtctctcta gagacaagct 1740
 ggggtgggtg gggctgacct ggctgagtc tctctaaac cttcttagc caagtggtgca 1800
 gactgtgttt atctacttta tggttttgaa aaatgtgtcc ttcct 1845

<210> 19

<211> 1170

<212> DNA

<213> Mouse

~~400~~ 19

atgcgttgcc gcaagtgcc gctctgcctg tcagcactgc tcacactcct gggectcaaa 60
~~gcaactag~~ agtggacatc cgagtcctgg cttaaaaagg ctgaaccccg gggcgctctg 120
 ccagtcaca caccaccaa tgctgagccc actctgccca ccaacctctc agcagcctg 180
 ggtcagactg gccactgtc ctctgcttac tggaaaccag agcagcggca gctgggagtc 240
 ctgcccagta cggactgtca gacttggggg actgttgctg cctcggagat cttggacttc 300
~~ccccgacc~~ ccaggagct tcggcgcttc ttgctgtcgg cggcctgtag gagctttcca 360
 ctatggctgc ctgcaggaga aggcagccct gtggccagct gctctgataa ggatgtaccc 420

tacttgctac tggctgtcaa atcagaacca ggacactttg cagcacggca ggctgtgagg 480
 gagacctggg gcagcccagt tgctgggacc cggttgctct tcctgctggg gtcccccta 540
 ggaatggggg ggcctgactt aagatcactg gtgacgtggg aaagccggcg ctatggtgac 600
 ctactgctct gggacttcct ggatgttccc tacaaccgga cactcaagga cctgctgctg 660
 ctgacctggc tgagccacca ctgccccgat gtcaattttg tcctgcaggt tcaggatgat 720
 gcctttgtgc acatcccagc cctactggag cacctgcaga ctctgccacc cacctgggcc 780
 cgcagcctct acctgggtga gatcttcacc caggccaaac cgctccgcaa gcccggagga 840
 cccttctatg tgccgaagac cttctttgaa ggggactatc cagcctatgc gaggggaggt 900
 ggctatgtaa tctcaggacg cctggcacc ttgctgctgc aggcggcagc tcgctgggca 960
 cccttccct ttgatgatgt ctacactggc ttctgcttc gtgccctggg cttagcacc 1020
 cgtgcccac caggcttcct cacagcctgg ccagcagaac gtaccaggga cccctgcgcc 1080
 gtgcgaggcc tgctcttggt gcatccagtc agccctcagg acaccatttg gctctggaga 1140
 catctgtggg tccagagct ccagtgtga 1170

<210> 20

<211> 389

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 20

Met Arg Cys Arg Lys Cys Gln Leu Cys Leu Ser Ala Leu Leu Thr Leu

1

5

10

15

Leu Gly Leu Lys Val Tyr Ile Glu Trp Thr Ser Glu Ser Trp Leu Lys

20

25

30

Lys Ala Glu Pro Arg Gly Ala Leu Pro Ser Pro Thr Pro Pro Asn Ala

35

40

45

Glu Pro Thr Leu Pro Thr Asn Leu Ser Ala Arg Leu Gly Glu Thr Gly

50

55

60

Pro Leu Ser Ser Ala Tyr Trp Asn Gln Gln Gln Arg Gln Leu Gly Val

65

70

75

80

Leu Pro Ser Thr Asp Cys Gln Thr Trp Gly Thr Val Ala Ala Ser Glu
 85 90 95
 Ile Leu Asp Phe Ile Leu Tyr Pro Gln Glu Leu Arg Arg Phe Leu Leu
 100 105 110
 Ser Ala Ala Cys Arg Ser Phe Pro Leu Trp Leu Pro Ala Gly Glu Gly
 115 120 125
 Ser Pro Val Ala Ser Cys Ser Asp Lys Asp Val Pro Tyr Leu Leu Leu
 130 135 140
 Ala Val Lys Ser Glu Pro Gly His Phe Ala Ala Arg Gln Ala Val Arg
 145 150 155 160
 Glu Thr Trp Gly Ser Pro Val Ala Gly Thr Arg Leu Leu Phe Leu Leu
 165 170 175
 Gly Ser Pro Leu Gly Met Gly Gly Pro Asp Leu Arg Ser Leu Val Thr
 180 185 190
 Trp Glu Ser Arg Arg Tyr Gly Asp Leu Leu Leu Trp Asp Phe Leu Asp
 195 200 205
 Val Asp Tyr Asn Arg Thr Leu Lys Asp Leu Leu Leu Leu Thr Trp Leu
 210 215 220
 Ser His His Cys Pro Asp Val Asn Phe Val Leu Gln Val Gln Asp Asp
 225 230 235 240
 Ala Phe Val His Ile Pro Ala Leu Leu Glu His Leu Gln Thr Leu Pro
 245 250 255
 Thr Trp Ala Arg Ser Leu Tyr Leu Gly Glu Ile Phe Thr Gln Ala
 260 265 270
 Leu Arg Lys Pro Gly Gly Pro Phe Tyr Val Pro Lys Thr Phe
 275 280 285
 Phe Glu Gly Asp Tyr Pro Ala Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Tyr Val Ile
 290 295 300
 Leu Ala Pro Trp Leu Leu Gln Ala Ala Ala Arg Val Ala
 305 310 315 320

Pro Phe Pro Phe Asp Asp Val Tyr Thr Gly Phe Cys Phe Arg Ala Leu
325 330 335

Gly Leu Ala Pro Arg Ala His Pro Gly Phe Leu Thr Ala Trp Pro Ala
340 345 350

Glu Arg Thr Arg Asp Pro Cys Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Val His
355 360 365

Pro Val Ser Pro Gln Asp Thr Ile Trp Leu Trp Arg His Leu Trp Val
370 375 380

Pro Glu Leu Gln Cys
385 389

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

P03/17030

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10, C07K16/40, C12Q1/48, C12N1/15,
C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN),
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/34485 A2 (ZYMOGENETICS), 15 June, 2000 (15.06.00), & EP 1137783 A2 & JP 2002-531131 A	1-23
X	US 6416988 B1 (ZYMOGENETICS), 09 July, 2002 (09.07.02), (Family: none)	1-23.
A	VAVASSEUR F. et al., Synthesis of O-glycan core 3: characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R beta 3- N-acetyl-glucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines., Glycobiology, 1995, Vol.5, No.3, pages 351 to 357	6-12

☐ Documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
" " document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
" " document published on or after the international filing
date
" " document which throws doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of completion of the international search
12 February, 2004 (12.02.04)

Date of mailing of the international search report
24 February, 2004 (24.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10, C07K16/40, C12Q1/48, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/34485 A2 (ZYMOGENETICS) 2000.06.15 & EP 1137783 A2 & JP 2002-531131 A	1-23
X	US 6416988 B1 (ZYMOGENETICS) 2002.07.09 (ファミリーなし)	1-23
A	VAVASSEUR F. et al., Synthesis of O-glycan core 3: characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R beta 3-N-acetyl-glucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines., Glycobiology, 1995, Vol.5, No.3, p.351-357	6-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の進歩性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.02.2004

国際調査報告の発出口

24.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.